

**VERSUCHE ZUR PROTEINBINDUNG
UND ZUR STEREOCHEMIE DER CHROMOPHORE
IN BILIPROTEIDEN UND MODELLVERBINDUNGEN**

Gerhard Klein

1977



Digitized by the Internet Archive
in 2026

VERSUCHE ZUR PROTEINBINDUNG
UND ZUR STEREOCHEMIE DER CHROMOPHORE
IN BILIPROTEIDEN UND MODELLVERBINDUNGEN

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
des
Fachbereiches Biologie
der
Ludwig-Maximilians-Universität

München



vorgelegt
von
Gerhard Klein
aus
Kaiserslautern

1977



1. Berichterstatter: Prof. Dr. W. Rüdiger
2. Berichterstatter: Prof. Dr. W. Rau

Tag der mündlichen Prüfung: 14.6.1977

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Leitung von Prof. Dr. W. Rüdiger am Botanischen Institut der Universität München angefertigt.

Herrn Prof. Rüdiger danke ich herzlich für die vielfältigen Anregungen, für seine stete Diskussionsbereitschaft und wertvollen Ratschläge, die den Fortgang der Arbeit erleichterten.

Frau I. Blos danke ich für die Aufnahme der Massenspektren.

Frau G. Schild, Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried, danke ich für die Aufnahme der Protonenkernelnresonanzspektren.

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung und Problemstellung	1
1.1. Verbreitung und Funktion von ausgewählten Bili- proteiden	1
1.1.1. Phycoerythrin und Phycocyanin	1
1.1.2. Phytochrom	2
1.2. Chemische Natur der untersuchten Biliproteide	3
1.2.1. Chromophor	3
1.2.2. Proteinanteil	5
1.2.3. Zur Bindung zwischen Chromophor und Protein	7
1.3. Modellsbstanzten für Biliproteide	9
1.4. Problemstellung	10
2. Untersuchungen an Modellen, die durch Abbau von substi- tuierten Tetrapyrrolsystemen gewonnen werden	11
2.1. Photoaddition von Cystein-Derivaten an Bilirubin (<u>1</u>) und Chromsäureabbau der Additionsprodukte	11
2.2. Versuche zur Photolyse des Thioäthers <u>11</u>	12
2.3. Weitere Bestrahlungsversuche	14
2.3.1. Synthese von Succinimiden	14
2.3.2. Bestrahlung der Imide	15
3. Synthese und Reaktionen von Modellverbindungen	18
3.1. Die Synthese von 2-(1-Chloräthyl)-3-methylsuccin- imid (<u>7</u>)	18
3.1.1. Stereoisomere der Chlor-Verbindung <u>7</u>	19
3.1.2. Zuordnung des kristallinen Isomeren der Chlor-Verbindung <u>7</u>	21
3.2. Bildung des Thioäthers <u>8</u> aus der Chlor-Verbindung <u>7</u>	24
3.2.1. Eliminierung der Chlor-Verbindung <u>7</u> durch Einwirkung von Basen	25
3.2.2. Addition von Äthanthiol an 2-Äthyliden-3- methylsuccinimid (<u>5/6</u>)	28
3.3. Behandlung des Thioäthers <u>8</u> mit Ammoniak	30
3.4. Behandlung des Thioäthers <u>8</u> mit Chromsäure	32
3.4.1. Chromsäureoxidation des Thioäthers <u>8</u> und Ver- gleich mit anderen Methoden der Thioäther- oxidation	32
3.4.2. Präparative Auftrennung und Charakterisierung der bei Behandlung des Thioäthers <u>8</u> mit Chrom- säure entstandenen Imidfraktionen	33

3.4.3. Interpretation der Protonenkernresonanzspektren der Sulfonisomeren <u>20a</u> und <u>20b</u> ; sterische Aspekte (I)	36
3.4.4. Röntgenstrukturanalyse des Sulfonisomeren <u>20b</u>	44
3.5. Behandlung des Sulfons <u>20</u> mit Ammoniak und Chromsäure	46
3.5.1. Auftrennung, Charakterisierung und quantitative Bestimmung der Eliminierungsprodukte	47
3.6. Sterische Aspekte (II)	49
3.6.1. Mechanismus der Eliminierungsreaktion	49
3.6.2. Interpretation der Eliminierungsergebnisse	50
3.6.3. Prüfung auf sterische Effekte bei der Addition und Konfigurationsumkehr bei der Chromsäureoxidation	52
3.7. Übertragung der Reaktionsfolge auf andere Thiole	56
3.7.1. Addition von Cystein an 2-Äthyliden-3-methylsuccinimid (<u>5/6</u>)	57
3.7.2. Behandlung des Thioäthers <u>9</u> mit Chromsäure	59
3.7.3. Behandlung des Thioäthers <u>9</u> mit Ammoniak und des Sulfons <u>29</u> mit Ammoniak und Chromsäure	61
3.7.4. Versuche mit Cystein-Derivaten	65
3.8. Schlußfolgerungen aus den Modellversuchen	66
3.8.1. Reaktivität an C-2'	66
3.8.2. Sterische Aussagen (III)	67
4. Übertragung der Modellversuche auf Biliproteide und ein Bilipeptid	68
4.1. C-Phycocyanin aus Pseudanabaena sp.	68
4.1.1. Isolierung und Charakterisierung von C-Phycocyanin	69
4.1.2. Chromsäureabbau und kombinierter CrO_3/NH_3 -Abbau	71
4.1.3. Interpretation der Ergebnisse; Strukturaussagen für C-Phycocyanin	75
4.2. C-Phycocerythrin aus Pseudanabaena sp.	78
4.2.1. Isolierung und Charakterisierung von C-Phycocerythrin	79
4.2.2. Chromsäureabbau und kombinierter CrO_3/NH_3 -Abbau	81
4.2.3. Interpretation der Ergebnisse; Strukturaussagen für C-Phycocerythrin	83
4.3. Chromopeptid von C-Phycocerythrin aus Pseudanabaena sp.	84

	Seite
4.3.1. Chromsäureabbau und kombinierter CrO_3/NH_3 - Abbau	85
4.3.2. Interpretation der Ergebnisse; Strukturaus- sagen für das Chromopeptid	86
4.4. Phytochrom aus <i>Avena sativa</i>	88
4.4.1. Isolierung und Charakterisierung von Phyto- chrom	89
4.4.2. Chromsäureabbau und kombinierter CrO_3/NH_3 - Abbau	91
4.4.3. Interpretation der Ergebnisse; Strukturaus- sagen für Phytochrom	95
4.5. Sterische Aussagen für die Biliproteide	100
4.6. Schlußbetrachtung	103
5. Experimenteller Teil	107
5.1. Methoden und Geräte	107
5.1.1. Dünnschichtchromatographie	107
5.1.2. Gaschromatographie der Imide	108
5.1.3. Präparative Säulenchromatographie	109
5.1.4. Geräte zur Aufnahme von Spektren	109
5.1.5. Sonstige apparative Voraussetzungen	110
5.2. Belichtungsversuche	110
5.2.1. Photoaddition	111
5.2.2. Photolyse des Thioäthers <u>11</u>	111
5.2.3. Bestrahlung von Imiden	112
5.2.4. UV-Einfluß auf die Thioladdition an <u>5/6</u> und <u>24</u>	113
5.3. Synthese von Succinimiden	113
5.3.1. 2-Acetyl-3-methylbernsteinsäure-diäthyl- ester (<u>16</u>)	113
5.3.2. 2-(1-Hydroxyäthyl)-3-methylbernsteinsäure- diäthylester (<u>26</u>)	114
5.3.3. 2-(1-Hydroxyäthyl)-3-methylsuccinimid (<u>27</u>)	114
5.3.4. 2-(1-Chloräthyl)-3-methylsuccinimid (<u>7</u>)	114
5.3.5. 2-Äthyliden-3-methylsuccinimid (<u>5</u> bzw. <u>6</u>)	116
5.3.6. 2-[1-(Äthylthio)äthyl]-3-methylsuccinimid (<u>8</u>)	116
5.3.7. S-[1-(4-Methyl-2,5-dioxo-3-pyrrolidinyl)äthyl]- cystein (<u>9</u>)	117
5.3.8. 2-[1-(Äthylsulfonyl)äthyl]-3-methylsuccinimid (<u>20</u>)	117
5.3.9. 2-[1-(4-Methyl-2,5-dioxo-3-pyrrolidinyl)äthyl- sulfonyl]alanin (<u>29</u>)	119

5.3.10.	S-[1-(4-Methyl-2,5-dioxo-3-pyrrolidinyl)-äthyl]cystein-methylester (<u>32</u>) und S-[1-(4-Methyl-2,5-dioxo-3-pyrrolidinyl)äthyl]-N-acetyl-cystein-methylester (<u>33</u>)	119
5.3.11.	2-(1-Aminoäthyliden)-3-methylsuccinimid (<u>17</u>)	120
5.3.12.	2-Acetyl-3-methylsuccinimid (<u>18</u>)	120
5.3.13.	2-[1-(Äthylthio)äthyliden]-3-methylsuccinimid (<u>19</u>)	120
5.4.	Reaktionen von Succinimiden	121
5.4.1.	Eliminierungsversuche mit quantitativer Bestimmung	121
5.4.2.	Untersuchung der Thioladdition ($\rightarrow$ <u>8</u>), Chromsäureoxidation ($\rightarrow$ <u>20</u>) und Eliminierung ($\rightarrow$ <u>5/6</u>) mit nach E-(<u>5</u>) und Z-(<u>6</u>)-Konfiguration getrenntem Ausgangsmaterial	123
5.4.3.	Oxidation des Thioäthers <u>8</u> mit CrO_3 in D_2SO_4	123
5.4.4.	Oxidation von <u>8</u> mit Kaliumpermanganat und Wasserstoffperoxid	124
5.4.5.	Versuche zur Kinetik der Eliminierung von <u>7</u> und zum Einfluß der Basenkonzentration	124
5.4.6.	Reaktionen der Acetylverbindung <u>18</u> mit Äthanthiol	125
5.5.	Isolierung von Biliproteiden	125
5.5.1.	Algenzucht	125
5.5.2.	Isolierung von C-Phycoerythrin und C-Phycocyanin aus <i>Pseudanabaena</i> sp.	126
5.5.3.	Isolierung von Phytochrom	127
5.6.	Chromsäure- und CrO_3/NH_3 -Abbauten von Biliproteiden und -peptiden	129
5.6.1.	Abbau von C-Phycoerythrin und C-Phycocyanin	129
5.6.2.	Abbau des Pentapeptids von C-Phycoerythrin	130
5.6.3.	Abbau von Phytochrom	131
5.6.4.	Vergleichssubstanzen	132
6.	Zusammenfassung	133

Abkürzungen

AS:	Ammoniumsulfat
ASF:	Ammoniumsulfatfällung
CrO_3/NH_3 -	
Abbau:	Chromsäure-/Ammoniak-Abbau
DC:	Dünnschichtchromatographie
FID:	Flammenionisationsdetektor
GC:	Gaschromatographie
IR:	Infrarot
MS:	Massenspektrum bzw. Massenspektrometer
NMR:	Nuclear Magnetic Resonance
P:	Phytochrom
P_R :	rot- (660 nm-) absorbierende Form von Phytochrom
P_{FR} :	dunkelrot- (730 nm-) absorbierende Form von Phytochrom
RT:	Raumtemperatur
TMS:	Tetramethylsilan
Tris:	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
UV:	Ultraviolett

1. Einleitung und Problemstellung

1.1. Verbreitung und Funktion von ausgewählten Biliproteiden

1.1.1. Phycoerythrin und Phycocyanin

Das Auftreten roter und blauer Farbstoffe in Algen hat zur Einteilung der betreffenden Algen in Rot- und Blaualgen geführt. Man hat diese ursprüngliche Namensgebung beibehalten, auch wenn bald das Vorkommen beider für die Farbe verantwortlicher Phycobiliproteide, des Phycoerythrins (rot) und des Phycocyanins (blau), jeweils sowohl in Rhodophyceen als auch in Cyanophyceen sowie in Cryptophyceen erkannt wurde. Später wurden die zuerst bei Cyanophyceen gefundenen Farbstoffe als C-Phycoerythrin und C-Phycocyanin bezeichnet, die zuerst aus Rhodophyceen gewonnenen entsprechend R-Phycoerythrin und R-Phycocyanin. Inzwischen gelten diese Bezeichnungen unabhängig von ihrem Auftreten für bestimmte Spektraltypen. Sie werden ergänzt durch das hauptsächlich bei Bangiophyciden gefundene B-Phycoerythrin, das bei fast allen Algengattungen auftretende Allophycocyanin und die bei Cryptophyceen gefundenen Cryptomonad-Phycoerythrin und Cryptomonad-Phycocyanin.

Abgesehen von der weiteren Unterteilung der bei Cryptophyceen gefundenen Phycobiliproteide (85), ist auch die Aufgliederung der übrigen Phycoerythrine und Phycocyanine nach dem angegebenen "historischen" Schema nicht einheitlich (48,87). Neueren Untersuchungen zufolge (R. WAGENMANN, persönl. Mitteilung) scheint der Artenreichtum der Phycobiliproteide insbesondere im Bereich der Erythrine noch ausgeprägter zu sein als bisher angenommen wurde (vgl. Tab.1 bei Lit. 87).

Den Schlüssel zur Erklärung der Funktion von Phycobiliproteiden in Algen lieferten Untersuchungen über das Wirkungsspektrum der Photosynthese bei Rotalgen (47) und vergleichende Messungen der Absorptions- und Fluoreszenzemissionsspektren (1,26,32):

Phycoerythrin und Phycocyanin absorbieren Licht in einem Bereich, in dem Chlorophyll eine Absorptionslücke aufweist, und übertragen diese Energie auf Chlorophyll. Auf diese Weise werden Algen mit Phycobiliproteiden ganz allgemein an lichtarmen Standorten durch bessere Nutzung des Absorptionsspektrums verstärkt zur Photosynthese befähigt.

Über den Mechanismus der Energieübertragung gibt es keine strenge Beweisführung; jedoch gibt es Hinweise auf eine stufenweise Übertragung der absorbierten Lichtenergie von Phycoerythrinen über Phycocyanine auf Chlorophyll a_{II} . Neuere Untersuchungen belegen für *Porphyridium cruentum* die zusätzliche Funktion von Allophycocyanin als Energieüberträger zwischen Phycocyanin und Chlorophyll (39). In jedem Fall ist für eine derartige Wirkung der Phycobiliproteide als akzessorische Pigmente des Photosystems II ein enger räumlicher Kontakt der beteiligten Pigmente erforderlich. Dieser ist in den Thylakoiden, die in Blau- und Rotalgen unterschiedlich organisiert sind, verwirklicht: Sämtliche in der Zelle vorhandenen Phycobiliproteide sind bei den Rhodophyceen und Cyanophyceen in den Phycobilisomen lokalisiert (37,87,111), die sich in Form kleiner Granula an der Thylakoidoberfläche befinden und somit dem eigentlichen Photosynthese-Apparat auch räumlich gewissermaßen vorgeschaltet sind. Bei den Cryptophyceen wird ein intrathylakoidaler Aufenthalt der Biliproteide diskutiert (38,109).

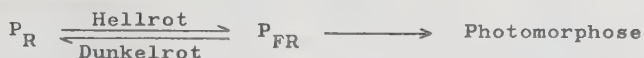
1.1.2. Phytochrom

Im Gegensatz zu den Farbstoffen der Algen ist für das Phytochrom die weite Verbreitung, besonders bei den höheren Pflanzen, und die Vielfalt der Funktionen charakteristisch. Da dem Phytochrom keine energiespeichernde, sondern eine dirigierende Wirkung zukommt, tritt es stets nur in sehr kleinen Mengen in der Pflanze auf und konnte deshalb auch erst sehr spät entdeckt werden. Ermöglicht wurde diese Entdeckung durch die Tatsache, daß Phytochrom in zwei photoreversiblen Formen auftritt, die sich gegenseitig ineinander überführen lassen. Aufgrund dieser Erkennungsmethode konnte Phytochrom dann bald isoliert und angereichert werden (18).

Die Photoreversibilität ist zugleich der Grund für die Vielgestaltigkeit der Wirkungsweisen von Phytochrom. Zuerst wurde der Einfluß des langwelligen Lichtes ($\lambda > 580 \text{ nm}$) auf die Morphogenese bei Pflanzen allgemein entdeckt (50), später die fördernde Wirkung geringer Dosen von Rotlicht ($\lambda_{\text{max}} = 660 \text{ nm}$) bei der Keimung von Salatsamen und deren Auslöschung durch nachfolgende Bestrahlung mit Dunkelrotlicht ($\lambda_{\text{max}} = 730 \text{ nm}$) erkannt (31). Dann konnte die photoreversible Wirkung von Rotlicht und Dunkelrotlicht auch bei der Regulation von Blatt- und Stengelwachstum,

bei der photoreversiblen Kontrolle des Blühens und bei der Biosynthese verschiedener Pigmente festgestellt werden (Zusammenfassung s. Lit. 36).

Inzwischen ist gesichert: Alle hellrot-dunkelrot reversiblen photomorphogenetischen Prozesse haben als Lichtrezeptor das Phytochrom, wobei durch Rotlicht die aktive Form induziert, durch Dunkelrotlicht die inaktive Form zurückgebildet wird. Als vereinfachtes Grundmodell kann daher folgende Formulierung angesehen werden:

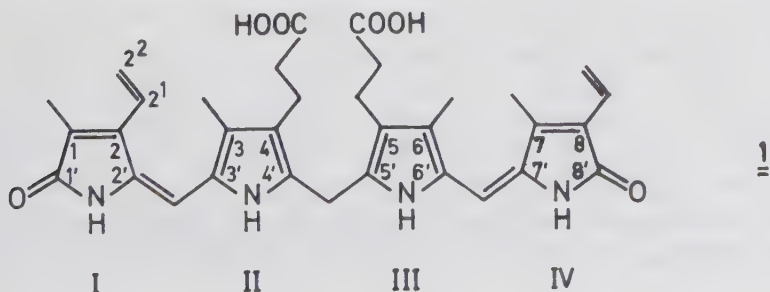


1.2. Chemische Natur der untersuchten Biliproteide

Sowohl für Phycoerythrin und Phycocyanin als auch für Phytochrom wurde die Zugehörigkeit zur Klasse der Biliproteide nachgewiesen. Als Biliproteide werden alle Chromoproteide bezeichnet, deren Chromophore Gallenfarbstoffe sind (85).

1.2.1. Chromophor

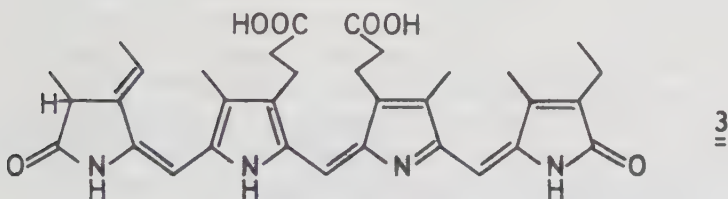
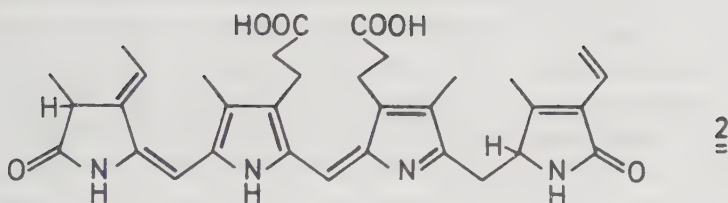
Gallenfarbstoffe oder Biline sind Verbindungen, deren Grundgerüst mit dem des Hauptfarbstoffs in der Galle des Menschen und der Vertebraten, des Bilirubins, übereinstimmt: Vier Pyrrol-Kerne sind über drei Methylen- oder Methin-Brücken miteinander verknüpft; die beiden äußeren Ringe enthalten Sauerstoff-Funktionen; drei Typen von Substituenten sind in einer ganz bestimmten Reihenfolge an dem Tetrapyrrol-Grundgerüst angeordnet.



Formal läßt sich diese Gruppe der Biline vom Protoporphyrin IX dadurch ableiten, daß dessen α -Methinbrücke oxidativ gespalten wird. So gelangt man zu den Bilinen der IX α -Reihe. Als Grundkörper ist hier das Bilirubin (1) mit der Nomenklatur der Ringssysteme nach FISCHER und ORTH (29) angeführt.

Die strukturelle Verwandtschaft der Biline mit den Porphyrinen läßt auf einen phylogenetischen Zusammenhang schließen. Tatsächlich ist für den vom Menschen ausgeschiedenen Gallenfarbstoff Bilirubin die Entstehung aus dem Porphyrin des Blutfarbstoffs durch Markierungsversuche nachgewiesen (101,102). In jüngerer Zeit hat TROXLER nach Fütterung von Rot- und Blaualgen mit ^{14}C -markierter δ -Aminolävulinsäure äquivalente Mengen an radioaktivem Kohlenmonoxid und Phycobilin erhalten (104,105). Daraus kann man schließen, daß auch bei den Algenfarbstoffen die Biosynthese über die Vorstufe der entsprechenden Porphyrin-Systeme verläuft. Dieser nahe strukturelle Zusammenhang einer ganzen Reihe physiologisch wichtiger Tetrapyrrol-Farbstoffe zeigt ganz allgemein, daß viele Untersuchungen an den einzelnen Chromophoren jeweils in einem gewissen Maß Modellcharakter für andere Tetrapyrrol-Systeme haben können.

Den Algenfarbstoffen Phycoerythrin und Phycocyanin liegen im wesentlichen zwei verschiedene Chromophore zugrunde: Das rote Phycoerythrobilin und das blaue Phycocyanobilin. Die beiden Biline unterscheiden sich hauptsächlich durch die Zahl der konjugierten Doppelbindungen. Ihre Strukturaufklärung wurde erschwert durch die Veränderung des konjugierten Systems bei der Abspaltung der Chromophore aus dem Protein (85). Die Nomenklatur ist deshalb auch nicht einheitlich. Logisch erscheint die von RÜDIGER vorgeschlagene Sprachregelung (84), nach der die nativen Gallenfarbstoffe mit ihrer im Biliproteid vorliegenden Zahl von konjugierten Doppelbindungen als Phycoerythrobilin (s. Kap. 4.2.3) und Phycocyanobilin (s. Kap. 4.1.3), die Gallenfarbstoffe nach Abspaltung aus dem Protein mit ihrem um eine Doppelbindung vermehrten konjugierten System als Phycobiliviolin (2) und Phycobiliverdin (3) bezeichnet werden. Es sollen hier wegen der später zu behandelnden Proteinbindung zunächst die abgespaltenen Chromophore aufgeführt werden, deren Struktur inzwischen gut gesichert ist (24,92,99).



Daß in einem Biliproteid-Molekül zwei verschiedene Chromophore auftreten können, ist ein wesentlicher Gesichtspunkt für die eingangs dargestellte komplexe Typologie der Algenfarbstoffe.

Der Chromophor des Phytochroms, das Phytochromobilin, hat nach neueren Versuchen (45) große Ähnlichkeit mit Phycocyanobilin, wobei das System der konjugierten Doppelbindungen bei der P_R -Form sogar als um eine Doppelbindung länger gegenüber der P_{FR} -Form angenommen werden muß, was aus Messung der Spektraldaten am denaturierten Phytochrom hervorgeht (Ergebnisse eigener Untersuchungen s. Kap. 4.4.3).

1.2.2. Proteinanteil

Seit KYLIN (60) ist der Eiweißcharakter von Phycoerythrin und Phycocyanin durch deren peptischen Abbau nachgewiesen. Zahlreiche Arbeiten belegen für Farbstoffe aus Rhodophyceen und Cyanophyceen Molekulargewichte von 200 000 - 300 000, für Cryptophyceen nur solche von 30 000 - 50 000. Dies ist offensichtlich nur durch die unterschiedlichen Organisationsformen der Phycobiliproteide in den entsprechenden Algen begründet, dergestalt, daß die Anordnung in Phycobilisomen mit einer höheren

Aggregation einhergeht (vgl. Kap. 1.1.1). Möglicherweise sind letztlich alle Phycobiliproteide aus den gleichen Grundbausteinen zusammengesetzt; denn man findet stets einen Aufbau aus leichteren (α -Kette) und schwereren (β -Kette) Untereinheiten. Ein Monomeres besteht jeweils aus einer α -Kette und einer β -Kette. Die nativ wirksamen Biliproteide sind dann stets Aggregate mehrerer Monomeren.*)

Die ausgeprägten Wechselwirkungen zwischen Chromophor und Protein bei allen Biliproteiden stellen neben der bereits erwähnten Variabilität der Chromophore den zweiten wesentlichen Grund für die Vielfalt der Typen von Biliproteiden dar. Die Proteinzusammensetzung in der unmittelbaren räumlichen Nachbarschaft des Chromophors beeinflusst das Elektronenspektrum des Farbstoffs in einem Maße, daß dadurch nicht nur die unterschiedliche Lage der Absorptionsmaxima bei den einzelnen Farbstofftypen, sondern auch die Verschiebung der Absorptionsmaxima von ein und demselben Typ nach Proteinveränderung (z.B. Einwirkung von Proteasen) erklärt werden kann. Auf diese Weise erlangt die Sequenzierung der mit dem Chromophor verknüpften Proteinabschnitte für das Verständnis der Elektronenspektren große Bedeutung.

Letzteres gilt in noch stärkerem Maße für das Phytochrom. Hier ist nach detaillierten Versuchen am denaturierten Biliprotein (45), nach denen der P_{FR} -Chromophor ein um eine Doppelbindung kürzeres konjugiertes System aufweist als der P_R -Chromophor, offenbar die unterschiedliche Proteinumgebung im nativen Phytochrom für die Lage der Absorptionsmaxima sehr wesentlich. So wird für das bei 730 nm absorbierende P_{FR} ein Bilin-Anion diskutiert, das z.B. durch Änderung der Proteinnachbarschaft gegenüber dem bei 660 nm absorbierenden P_R erklärt werden könnte (44). Damit scheint die reversible Umwandlung der beiden Formen nur mit Hilfe des Proteinanteils möglich zu sein. Im Anschluß an die Phototransformation von P_R in P_{FR} kommt es dann zur Auslösung photomorphogenetischer Effekte, für die nach vielfältigen Versuchen offenbar die Assoziation von P_{FR} an spezifischen Rezeptoren

*) Eine Übersicht über die Molekulargewichte der α - und β -Kette aus verschiedenen Organismen findet sich in Lit. 87. Auf die Anzahl der Chromophore in beiden Ketten wird in den Kapiteln 4.1. und 4.2. eingegangen.

(z.B. Membranen) notwendig ist. Für diese entscheidenden Phytochrom-Eigenschaften ist die Struktur des Proteins verantwortlich.

Nach dem neuesten Stand der Dinge (78) ist nativ wirksames Phytochrom ein Dimeres zweier Proteinketten, für die elektrophoretisch ein Molekulargewicht von je 120 000 gefunden wurde (77). Für dieses Dimere von 240 000 Dalton werden zwei Chromophore angenommen. Bei Phytochrom-Fractionen mit höheren Molekulargewichten als 800 000 werden Komplexe von Phytochrom mit (spezifischen) Rezeptoren diskutiert.

1.2.3. Zur Bindung zwischen Chromophor und Protein

a) Phycoerythrin und Phycocyanin

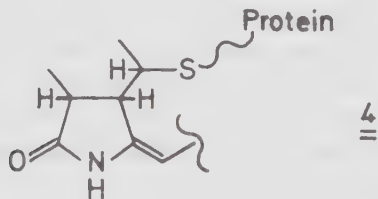
Für die kovalenten Verknüpfungen zwischen Protein und Chromophor in den Algenfarbstoffen sind zahlreiche Strukturvorschläge gemacht worden. Sie fielen aufgrund sehr verschiedener analytischer Methoden z.T. schwer verifizierbar, meist jedoch unvollständig aus. Ein ganz entscheidender Schritt zur Aufklärung gelang RÜDIGER mit der gut reproduzierbaren Methode des Chromsäure-/Chromatabaus (83). Durch kombinierte Anwendung dieser Abbaumethode für Tetrapyrrol-Systeme bei RT und bei 100° konnte für mehrere Phycoerythrine und Phycocyanine die Bindung des Proteinanteils an den Pyrrolkernen I und III des Chromophors geklärt werden (81,82,83,84). Andere, dazu im Gegensatz stehende Strukturvorschläge (15,16,23,24, 61,71), beziehen sich z.T. mehr auf die chemische Natur der Verknüpfung, z.T. mehr auf die Wahrscheinlichkeit der Bindung bestimmter funktioneller Gruppen von Aminosäuren, die in Chromopeptiden gefunden wurden.

Über die Art der kovalenten Bindung an Ring III des Chromophors gibt es noch keine gesicherten Aussagen. Diskutiert werden eine Amidbindung (61) sowie eine Esterbindung (71,72) über die Carboxylgruppe der Propionsäure-Seitenkette.

Die Spekulationen über die Art der Bindung an Ring I waren vielfältiger. CRESPI et al. (24) vermuteten aufgrund von ^1H -Austausch-Reaktionen bei vollständig deuterierten Phycocyaninen eine Bindung an C-2². Später isolierten CRESPI und SMITH (23) verschiedene Chromopeptide aus Phycocyanin und formulierten zwei kovalente Bindungen an Ring I: Eine Thioäther-Verknüpfung über die SH-Gruppe von Cystein an C-2¹, ähnlich wie beim Cytochrom c (66), sowie eine Esterbindung zwischen Asparaginsäure und dem Hydroxypyrrol

der Lactimform von Ring I. RÜDIGER postulierte anhand der hydrolytischen Spaltbarkeit zunächst eine N-Acyl-Bindung (84). Später wurde wegen der möglichen bindenden Aminosäure-Funktionen eine Äther-Verknüpfung der OH-Gruppe von Serin an C-2¹ angenommen (85). KÖST et al. (55) formulierten erstmals eine Thioäther-Verknüpfung analog zu der von CRESPI und SMITH (23), jedoch ohne weitere Proteinbindung an Ring I (4). Dieser Vorschlag gründet sich auf folgende Daten, die aus Versuchen an einem B-Phycoerythrin aus *Porphyridium cruentum* entnommen wurden:

1. Bindende Aminosäure ist Cystein, einzige in Frage kommende funktionelle Gruppe die SH-Gruppe (vgl. auch Lit. 56).
2. Die abgespaltenen Chromophore enthalten eine Doppelbindung mehr als die im nativen Biliproteid zugrundeliegenden Pigmente.
3. Diese neu entstehende Doppelbindung ist die der Äthylidengruppe. Dafür sprechen a) der Spektralvergleich des Chromophors mit Mesobilirrhodin (90), b) die Bildung von Z-E-Isomeren in bezug auf die Äthylidengruppe bei der Abspaltung (vgl. auch Lit. 54), c) die Kinetik der Umwandlung in ein Urobilin (vgl. auch Lit. 55), d) Eliminierungsversuche an Modells-substanzen (s. Kap. 1.3. und Lit. 95).



Dieser Strukturvorschlag sollte für B-Phycoerythrin aus *Porphyridium cruentum* und für C-Phycocyanin aus *Anacystis nidulans* Gültigkeit haben. Da jedoch bei einigen Versuchen bedeutende graduelle Unterschiede zwischen den beiden Farbstoffen zu Tage traten, wurde die Struktur später vorerst nur für B-Phycoerythrin als verbindlich postuliert (55,87). Weitere Untersuchungen stützten den neuen Strukturvorschlag (96). Ein zuverlässiger Nachweis für eine breitere Gültigkeit, insbesondere für Phycocyanin, steht jedoch noch aus.

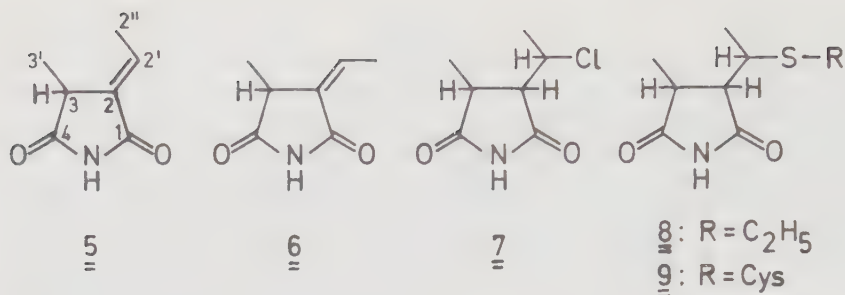
b) Phytochrom

Über die kovalenten Bindungen zwischen Chromophor und Protein beim Phytochrom gibt es bisher wesentlich weniger Versuchsdaten als bei den Algenfarbstoffen. RÜDIGER und CORRELL (88) vermuteten zwei Verknüpfungsstellen an Ring III und IV für P_R , drei Bindungen an Ring I, III und IV für P_{FR} . Später wurde die Bindung an Ring IV als Artefakt angesehen (85). RÜDIGER postulierte schließlich wie bei den Algenfarbstoffen für natives Phytochrom zwei Verknüpfungsstellen an Ring I und III sowohl bei P_R wie bei P_{FR} (85,86,87). Über die chemische Natur beider Bindungen gab es keine gesicherte Aussage.

1.3. Modellsubstanzen für Biliproteide

Die Synthese einzelner substituierter Succinimide hat seit längerem Bedeutung für die Identifizierung von Abbauprodukten des Chromsäureabbaus bei Gallenfarbstoffen. So gelang RÜDIGER und KLOSE (89) durch Synthese von 2-Äthyliden-3-methylsuccinimid (5) die Identifizierung des Abbauproduktes aus Ring I des Gallenfarbstoffes Aplysiocyanin. Die von BROCKMANN und KNOBLOCH (11,12) beschriebene Stereoisomerie von 2-Äthyliden-3-methylsuccinimid (E- und Z-konfiguriert: 5 und 6) anhand präparativer Arbeiten an Succin- und Maleinimiden ermöglichte KÖST und RÜDIGER (54) die Aussage, daß sowohl 5 als auch 6 beim hydrolytischen Chromsäureabbau von B-Phycocyanin als Abbauprodukt von Ring I auftreten.

In neuerer Zeit wurde der Modellcharakter präparativer Imidsynthesen von SCHÖCH et al. (95,96) durch Einbeziehung der Bindung zwischen Protein und Ring I des Chromophors erweitert. Eine wichtige Zwischenverbindung auf diesem Syntheseweg stellt das 2-(1-Chloräthyl)-3-methylsuccinimid (7) dar, dessen Reaktivität an C-2' bereits Modellcharakter besitzt. Offen war das Verhalten von 7 gegen Säuren und Basen. Die Umsetzung von 7 mit Thiolen im Basischen führt zu Thioäthern, die als Modelle für das nach Chromsäureabbau in der Kälte noch mit dem Protein verknüpfte Imid von Ring I des Chromophors gelten können (8 und 9). Das Verhalten dieser Thioäther gegen Säuren und Basen, insbesondere bei Behandlung mit Chromsäure, war im Hinblick auf die chemischen Eigenschaften der Proteinverknüpfung von Interesse. Allgemein war zu erwarten, daß eine Analogie der Reaktionen bei Modellen und Biliproteiden auf eine Analogie der Struktur schließen ließe.



Die bei $\underline{5}$ angegebene Nomenklatur wird im folgenden bei allen Imiden verwendet; es ist darauf zu achten, daß C-3 im Imid C-1 im Farbstoff und C-2' im Imid C-2' im Farbstoff entspricht.

Eine andere Möglichkeit, derartige Modelle für Ring I zu erhalten, besteht im oxidativen Abbau entsprechend substituierter Tetrapyrrolsysteme. So wurde versucht, durch Chromsäureabbau von "Porphyrin c" (107) ($\underline{10}$) zum S-[1-(4-Methyl-2,5-dioxo-3-pyrrolinyl)-äthyl]cystein ($\underline{11}$) und durch dessen Hydrierung zum analogen Succinimid zu gelangen (51). Dieser Weg erwies sich als schwierig; die dabei erzielten Ergebnisse sollten jedoch durch Abbau ähnlicher Addukte abgesichert werden.

1.4. Problemstellung

Der Abbau eines Photoadduktes von Cystein an Bilirubin sollte untersucht und der dabei gebildete Thioäther durch UV-Bestrahlung auf seine Beständigkeit geprüft werden.

In Fortführung der Arbeit an synthetischen Modellimiden sollte die Reaktivität der Chlor-Verbindung $\underline{7}$ gegenüber Säuren und Basen geklärt und dabei festgestellt werden, ob die wegen der drei Asymmetriezentren zu erwartenden Stereoisomeren verschiedene Reaktionen geben. Auf diese Weise waren Aufschlüsse über die Reaktion $\underline{7} \rightarrow \underline{8}$, die ja im Basischen stattfindet, zu erwarten.

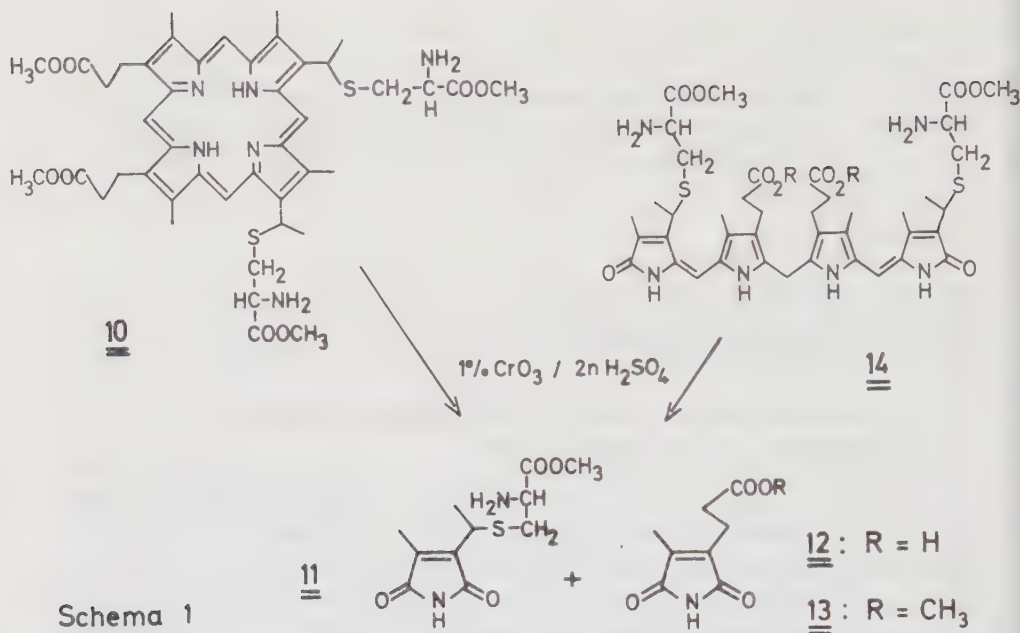
Die Reaktionen der Thioäther-Modelle $\underline{8}$ und $\underline{9}$ mit Säuren und Basen, besonders mit Chromsäure, sollten untersucht werden; aufgrund der chromatographischen Trennbarkeit von E- und Z-konfigurierten Imiden mit exocyclischer Doppelbindung (z.B. $\underline{5}$ und $\underline{6}$) einerseits (11,12, 54) und von cis- und trans-konfigurierten Succinimiden andererseits (12) sollten hierbei Aussagen über sterische Konfigurationen in den Thioäthern bzw. deren Derivaten und das Reaktionsverhalten in Abhängigkeit von der Stereochemie erzielt werden.

Die anhand der Versuche mit den Modellsubstanzen entwickelten Methoden sollten auf die eingangs näher beschriebenen Biliproteide bzw. Bilipeptide übertragen werden. In diesem Fall war zu erwarten, daß sich die Thioätherstruktur der Proteinverknüpfung in den Biliproteiden entweder sicher nachweisen oder ausschließen lassen würde.

2. Untersuchungen an Modellen, die durch Abbau von substituierten Tetrapyrrolosystemen gewonnen werden

2.1. Photoaddition von Cystein-Derivaten an Bilirubin (1) und Chromsäureabbau der Additionsprodukte

Bilirubin (1) addiert unter UV-Einwirkung freie OH- und SH-Gruppen an die Vinylgruppen bevorzugt von Ring IV, aber auch von Ring I (65). Die von MANNITTO und MONTI (63,64) für zahlreiche Verbindungen, darunter auch N-Acetyl-Cystein, beschriebene Addition wurde mit Cystein-methylester und N-Acetyl-Cystein durchgeführt. Dabei zeigte sich, daß das vorgelegte Pigment, anders als bei MANNITTO beschrieben, großteils zum grünen Biliverdin-Chromophor oxidiert wird. Außerdem verläuft die Addition im Sauren glatter als im Neutralen. Die 20 Minuten im UV des Wellenlängenbereiches $\lambda > 240$ nm bestrahlte Pigmentlösung wurde an Polyamid/Cellulose-Platten in präparativer DC aufgetrennt. Beim Addukt des Cystein-methylesters wurden von sieben Hauptzonen die vier mit höheren R_F -Werten eluiert und einem Chromsäureabbau unterzogen. Die beiden grün-gelben Zonen mit den höchsten R_F -Werten liefern neben dem erwarteten Hämatinsäureimid (12), dessen Methylester 13 und anderen Imiden ein Abbauprodukt, das sowohl mit Ninhydrin als auch mit Chlor/Benzidin (76) eine positive Reaktion ergibt. Dieses Imid (11) zeigt genau die gleichen chromatographischen Eigenschaften und das gleiche Extraktionsverhalten (nur im Neutralen extrahierbar) wie das beim Chromsäureabbau von verestertem "Porphyrin c" (10) gewonnene Abbauprodukt (51), welches ebenfalls mit Ninhydrin und Chlor/Benzidin nachweisbar ist. Ebenso weist es die gleiche leichte Zersetzlichkeit wie das Abbauprodukt von verestertem "Porphyrin c" auf, so daß man annehmen kann, daß es sich in beiden Fällen um identische Verbindungen handelt, 11 also beim Abbau sowohl von verestertem "Porphyrin c" (10) als auch des Photoadduktes 14 entsteht (Schema 1),



Schema 1

Dieses Versuchsergebnis steht einerseits mit den früheren Ergebnissen beim Chromsäureabbau von verestertem "Porphyrin c" (51), andererseits mit den Befunden bei der Photoaddition von Thiolen (63,64) in Einklang.

2.2. Versuche zur Photolyse des Thioäthers 11

Die Instabilität von 11, besonders bei dessen chromatographischer Isolierung, läßt eine leichte photolytische Destruktion möglich erscheinen. Um diese Möglichkeit zu prüfen, wurde die Lösung des Chromsäureabbaus der Pigment-Addukte zwei Stunden unter den Bedingungen der Photoaddition bestrahlt. Diese Behandlung führt zur nahezu quantitativen Zerstörung von 11. In einem Parallelversuch konnte sichergestellt werden, daß in der Pigmentlösung selbst bei längerer Strahlungsdauer keine merkliche Einbuße an gebildetem Photoaddukt nachzuweisen ist; auch beim anschließenden Chromsäureabbau einer zwei Stunden bestrahlten Pigmentlösung tritt 11 unvermindert auf.

Anstelle von 11 entsteht zu etwa 30-40% bei dessen Photolyse ein Imid, das keinem der übrigen aus dem Pigment stammenden Ringe ent-

spricht (Ausbeute in der DC abgeschätzt). Dieses Imid konnte nach Isolierung und Reinigung durch MS und DC-Vergleich mit synthetischem Material als E-2-Äthyliden-3-methylsuccinimid (5) identifiziert werden. Das Massenspektrum der isolierten Substanz 5 zeigt Abbildung 1.

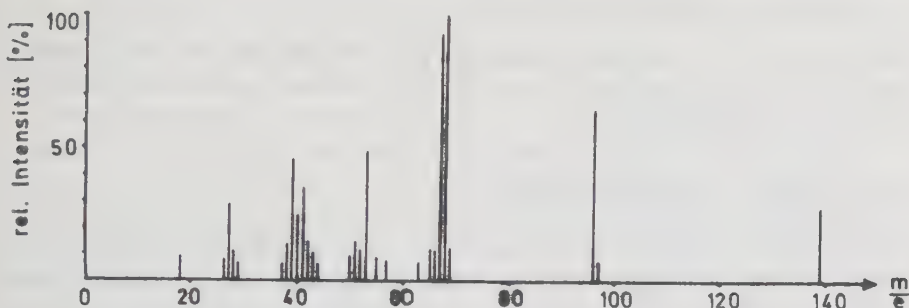
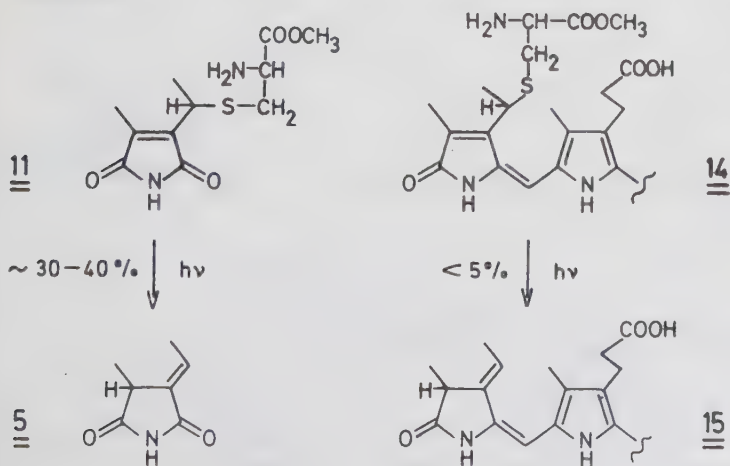


Abb. 1: Massenspektrum von E-2-Äthyliden-3-methylsuccinimid (5), das bei der Photolyse des Thioäthers 11 entsteht. Ionisationsenergie 75 eV, Proben temperatur 95°, Quellentemperatur 130°. Zugehörige Werte s. Tabelle 7, S. 112

5 läßt sich dünnschichtchromatographisch in Spuren auch beim Chromsäureabbau einer zuvor länger bestrahlten Pigment-Adduktlösung nachweisen. Das bedeutet, daß die Umwandlung des Thioäthers an der Äthylseitenkette eines Pigmentringes mit endocyclischer Doppelbindung (14) zu einer Struktur mit exocyclischer Äthylidenbindung (15) auch schon in geringem Ausmaß beim Pigment-Addukt verläuft (Schema 2).



Schema 2

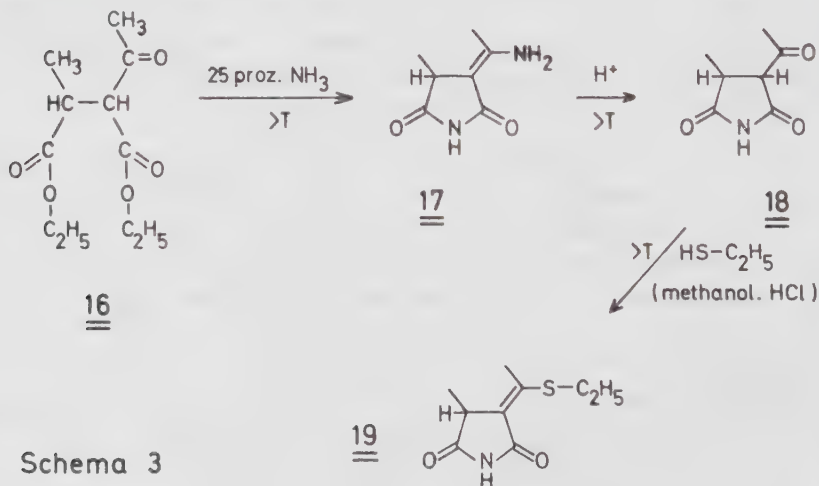
Bei der Photolyse von 11 kann man zudem das Ausfallen eines weißen Niederschlages beobachten, welcher laut DC Cystinmethylester sein dürfte.

2.3. Weitere Bestrahlungsversuche

Aufgrund des überraschenden Ergebnisses der Photolyse von 11 wurde das Verhalten von Malein- und Succinimiden bei Bestrahlung mit UV-Licht näher untersucht.

2.3.1. Synthese von Succinimiden ^{*)}

Ausgangsmaterialien sind 2-Brompropionsäure und Acetessigsäure-äthylester, die sich in einer seit CONRAD (21) geläufigen Kondensationsreaktion zu 2-Acetyl-3-methylbernsteinsäure-diäthylester (16) vereinigen. 16 wird mit einem Überschuß an konzentriertem Ammoniak erhitzt, wobei sich 2-(1-Aminoäthyliden)-3-methylsuccinimid (17) bildet. Durch saure Hydrolyse entsteht aus dem Enamin 17 das 2-Acetyl-3-methylsuccinimid (18). Wird 18 in 10%iger methanolischer Salzsäure mit einem Überschuß von Äthanthiol erhitzt, so fällt kristallin das 2-[1-(Äthylthio)äthyliden]-3-methylsuccinimid (19) aus (Schema 3).



Schema 3

^{*)} Der Reaktionsweg wurde von S. SCHOCH entwickelt

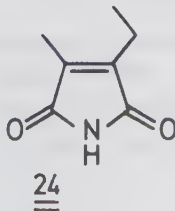
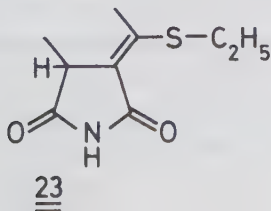
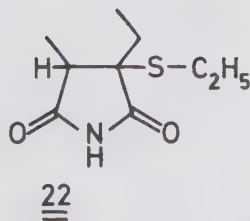
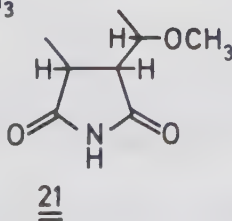
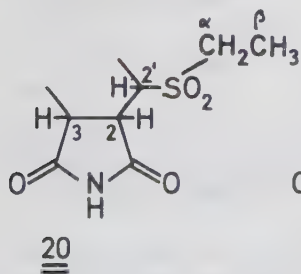
Eine interessante Farbreaktion tritt bei folgendem Versuch auf: Wird der Reaktionsansatz bei Synthese von 19, der aus einem Gemisch von 18, 19 und Äthanthiol besteht, zur Trockne eingengt und in einer Mischung aus Methanol und wäßrigem Ammoniak aufgenommen, so entsteht eine orange bis rot gefärbte Lösung.

Bleibt diese Lösung verschlossen etwa zwei Stunden stehen, so entfärbt sie sich bis schwach gelblich; gleichzeitig flockt ein grünlicher Niederschlag aus. Öffnet man das Gefäß und schüttelt es um, so färbt sich die Lösung wieder rot, wobei der Niederschlag verschwindet. Dieser Vorgang läßt sich mehrfach wiederholen. Ge-steigert wird die Farbtintensität beim Schütteln unter Luftzutritt durch Zugabe von Äthanthiol. Es tritt dann eine tiefroter Farbe auf, die dann auch etwas länger braucht, bis sie beim Stehen unter Luft-abschluß wieder verschwindet. Entsprechend verstärkt ist dabei die Bildung des Niederschlages.

2.3.2. Bestrahlung der Imide

Die Succinimide 17, 18 und 19 sowie folgende weitere Imide wurden in neutraler methanolischer Lösung jeweils zwei Stunden mit dem UV-Licht einer Quecksilberhochdrucklampe bestrahlt:

E-2-Äthyliden-3-methylsuccinimid (5), Z-2-Äthyliden-3-methylsuccinimid (6), 2-[1-(Äthylthio)äthyl]-3-methylsuccinimid (8), 2-[1-(Äthylsulfonyl)äthyl]-3-methylsuccinimid (20), 2-(1-Methoxy-äthyl)-3-methylsuccinimid (21), 2-Äthylthio-2-äthyl-3-methylsuccinimid (22), 2-[1-(Äthylsulfinyl)äthyliden]-3-methylsuccinimid (23) und 2-Äthyl-3-methylmaleinimid (24).



Bei den eingesetzten Imiden kann man bezüglich ihrer Empfindlichkeit gegen UV drei Gruppen unterscheiden (vgl. Abb. 2):

1. Imide, die überhaupt keine Veränderung durch Bestrahlung erleiden. Dazu gehören die Succinimide, die neben der Imidgruppe keine Doppelbindung und keinen Thioäther aufweisen: 20 und 21, sowie das Enamin 17.
2. Imide, die in geringem Ausmaß unspezifisch photolysiert werden. Dazu zählen die Thioäther ohne Doppelbindung, 8 und 22, sowie die Acetylverbindung 18.
3. Imide, die in erkennbarem Ausmaß definierte Umwandlungen zeigen. Dies betrifft die meisten Imide mit Doppelbindung. Am wenigsten photoaktiv sind 5 und 6; bei beiden zeigt sich eine geringfügige Isomerisierungstendenz: Aus 5 entsteht etwas 6, aus 6 etwas 5; die Hauptmenge des eingesetzten Isomeren bleibt erhalten. Es kann keine Dimerisierung beobachtet werden.

Bei 19 und 23, den Succinimiden mit exocyclischer Doppelbindung und funktioneller Gruppe an C-2' entsteht bei UV-Einwirkung jeweils in etwas größerer Menge ($\sim 20\%$) eine neue Verbindung (s. Abb. 2). Es ist möglich, daß hier eine Dimerisierung vorliegt.

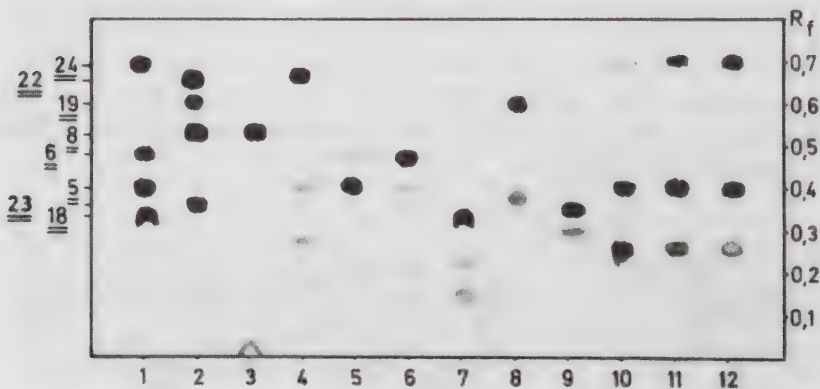


Abb.2: DC der Bestrahlungsversuche mit Succin- und Maleinimiden; UV: > 240 nm; Bestr.-dauer: 2 h; Lösungsmittel: Methanol.

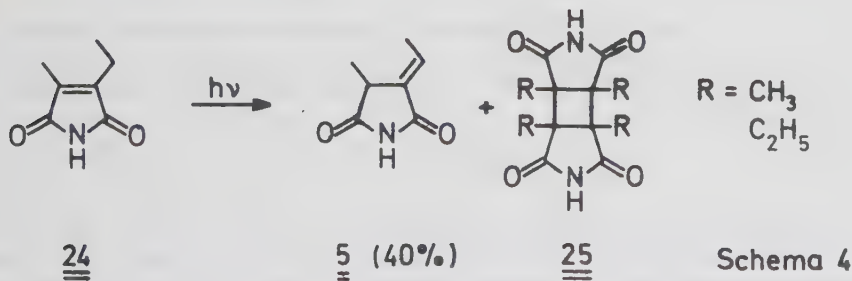
Trägermaterial: Kieselgel GF₂₅₄; Fließmittel Id (s.Tab. 6, S. 107); Nachweis: $\text{Cl}_2/\text{Benzidin}$.

- | | | | |
|--|--------------|--------------|-----------------------|
| 1) Vergleich: <u>5</u> , <u>6</u> , <u>18</u> , <u>24</u> | 3) <u>8</u> | 6) <u>6</u> | 10) <u>24</u> , pH=7 |
| 2) Vergleich: <u>8</u> , <u>19</u> , <u>22</u> , <u>23</u> | 4) <u>22</u> | 7) <u>18</u> | 11) <u>24</u> , pH=10 |
| 3)-12): nach Bestrahlung | 5) <u>5</u> | 8) <u>19</u> | 12) <u>24</u> , pH=1 |
| | | 9) <u>23</u> | |

Eine auffallend spezifische Photoreaktion liefert das Maleinimid 24: Die Substanz wandelt sich bis auf geringe Spuren vollständig in zwei andere Imide um. Eines davon konnte wiederum mit Massenspektrum und chromatographischem Vergleich als 5 identifiziert werden.

Für das andere läßt sich aus der gut untersuchten Photochemie von Maleinimiden die Struktur 25 ableiten. SCHENCK et al. (93) beschreiben die glatte Bildung des Dimeren 25 mit $R=CH_3$ aus Dimethylmaleinimid (in 84% Ausbeute). Da dort ähnliche Bedingungen wie im vorliegenden Versuch gegeben waren (gleiche Lichtquelle und Filterwirkung, in diesem Fall durch ein Kühlmantelglas), ist die Photodimerisierung von 24 sehr wahrscheinlich. Daß eine Äthylgruppe anstelle einer Methylgruppe die Bildung von Dimeren bereits sterisch behindert, ist nicht anzunehmen.

Die Photoumwandlung von 24 in 5 verläuft etwa zu 40% (Schema 4). Dies ist unabhängig vom pH-Wert der Lösung (s. Abb. 2). Dagegen ist die Bildung von 25 aus 24 bei UV-Bestrahlung vom pH-Wert der Lösung abhängig: 25 entsteht nur im Neutralen in größeren Mengen, im Säuren und Ammoniakalischen bleibt 24 großteils erhalten, während 25 nur in geringer Menge auftritt.



Aufgrund der Daten, die bei UV-Einwirkung auf 11 und die übrigen Imide erhalten wurden, kann man annehmen, daß folgender Mechanismus bei der Destruktion von 11 eine Rolle spielt: Die Thioätherbindung unterliegt einer photolytischen Spaltung, sobald eine endocyclische Doppelbindung in α -Stellung vorliegt. Die Tendenz der endocyclischen Doppelbindung, sich unter den gewählten Bedingungen in eine offenbar thermodynamisch stabilere exocyclische umzulagern, verstärkt dabei den Effekt der Abspaltung des Thioäthers. Durch eine gleichzeitig stattfindende Redoxreaktion wird das photolysierte 11 zu 5 reduziert.

3. Synthese und Reaktionen von Modellverbindungen

Ziel der Modellsynthese sollten Succinimide sein, wie sie in Kapitel 1.3. beschrieben sind: Modelle für Ring I des Chromophors einschließlich der Verknüpfung mit dem Proteinanteil. Zur Einführung einer Thioätherbindung an C-2' sollte als Vorstufe ein Succinimid mit einer reaktiven funktionellen Gruppe an dieser Position synthetisiert werden. Die geforderten Eigenschaften konnten von der entsprechenden Chlor-Verbindung (7) erwartet werden.

Vergleicht man das chemische Verhalten von 7 mit dem typischer schwefelhaltiger Modellimide, so kann man diese Verbindung bereits als Modellsubstanz im weiteren Sinn ansehen, die wichtige Informationen über die Reaktivität und vor allem die sterischen Verhältnisse derartig substituierter Imidstrukturen liefert.

Durch Umsetzung von 7 mit SH-Gruppenträgern gelangt man zu den gewünschten Thioäthern. Der Verlauf dieser Reaktion sowie weitere Reaktionen von Thioäthern und deren Derivaten werden im folgenden näher beschrieben.

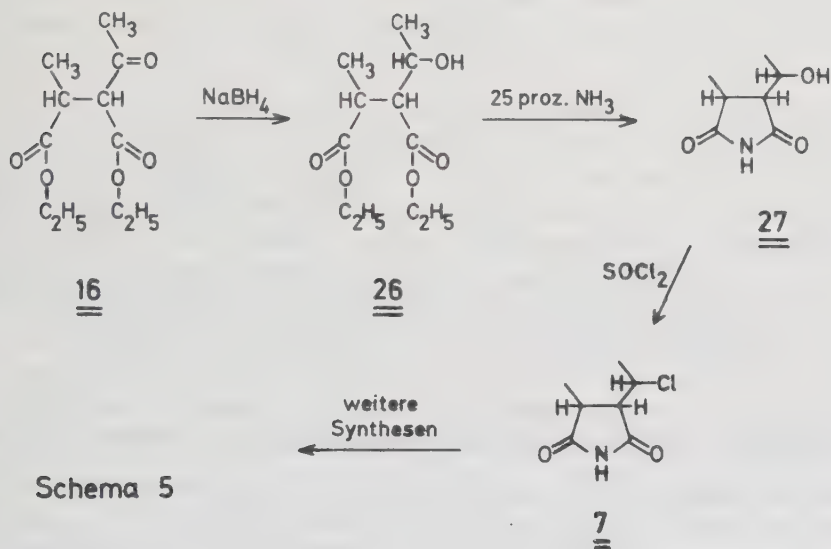
Bereits bei den Vorstufen von 7 wurden entsprechend den vorhandenen Asymmetriezentren Gemische von Stereoisomeren beobachtet (96). Da sich außerdem herausstellte, daß Qualität und Quantität der nachfolgenden Reaktionen mit den relativen Konfigurationen der beteiligten Reaktanten in direktem Zusammenhang stehen, wird die Behandlung sterischer Fragen jeweils parallel mit den einzelnen Reaktionsschritten erfolgen.

3.1. Die Synthese von 2-(1-Chloräthyl)-3-methylsuccinimid (7) *)

Ausgangsmaterial ist wie bei der Synthese von 17, 18 und 19 der Keto-Ester 16. Die Ketogruppe von 16 wird durch spezifische Reduktion mit Natriumborhydrid zur Hydroxylgruppe umgewandelt, so daß 2-(1-Hydroxyäthyl)-3-methylbernsteinsäure-diäthylester (26) entsteht. Der Ringschluß zum Succinimid wird mit einem Überschuß an konzentriertem Ammoniak erreicht. Es bildet sich 2-(1-Hydroxyäthyl)-3-methylsuccinimid (27). Die entscheidende funktionelle Gruppe wird durch nukleophile Substitution mit Thionylchlorid eingeführt, wobei die Hydroxylgruppe durch Chlor ersetzt wird. Das entstehende 2-(1-Chloräthyl)-3-methylsuccinimid (7) ist

*) Der Syntheseweg wurde von S. SCHOCH entwickelt

Ausgangsverbindung für alle weiteren Synthesen (Schema 5).



Schema 5

3.1.1. Stereoisomere der Chlor-Verbindung 7

Die Synthese von 7 führt zu zwei chromatographisch voneinander trennbaren Fraktionen des Imids. Im DC weisen die beiden Fraktionen bei Verwendung des Standardfließmittels (s. Abb. 4a, S. 26) R_f -Werte von 0,25 und 0,35 auf. Die Fraktion mit $R_f = 0,25$ entsteht dabei in etwa dreimal so großer Ausbeute wie die Fraktion mit $R_f = 0,35$.

Bei drei Asymmetriezentren werden vier Diastereomerenpaare erwartet. Als Kriterien der Trennbarkeit kommen die unterschiedliche relative Konfiguration zwischen C-2 und C-3 (angular) einerseits und C-2 und C-2' andererseits in Frage. Aufgrund des größeren räumlichen Unterschiedes sind vermutlich die cis- von den trans-Verbindungen (angulare Konfiguration an C-2/C-3) eher zu trennen als die Isomeren, die verschiedene relative Konfigurationen an C-2/C-2' aufweisen. Die dünnschichtchromatographische Trennung einer cis- von einer trans-Form ist für das 2-Äthyl-3-methylsuccinimid (42) von KNOBLOCH beschrieben worden (12,52) (s. auch S.101). Trotzdem kann nicht ganz ausgeschlossen werden, daß in einer oder beiden Fraktionen verschiedene Kombinationen von rela-

tiven Konfigurationen auftreten. Es soll daher eine Benennung zunächst nur nach dem chromatographischen Verhalten erfolgen: Die Fraktion mit tieferem R_f -Wert (0,25) soll im folgenden dem Buchstaben a, die mit höherem R_f -Wert (0,35) dem Buchstaben b zugeordnet werden.

Eine präparative Trennung über eine Kieselgel-Säule bringt keine Reinigung der Fraktionen. Zwar läßt sich 7a von 7b gut abtrennen, aber das Imid geht auf der Säule zum großen Teil unter Abspaltung von HCl in das Eliminierungsprodukt 2-Äthyliden-3-methylsuccinimid (5/6) über. Da 7a ausschließlich zu 5, 7b ausschließlich zu 6 eliminiert und die Isomeren der Ausgangsverbindung ähnliche chromatographische Eigenschaften wie ihre jeweiligen Eliminierungsprodukte aufweisen, liegt im Säuleneluat 7a im Gemisch mit 5, 7b im Gemisch mit 6 vor. Eine analytische Trennung der Isomeren 7a und 7b von ihren jeweiligen Eliminierungsprodukten gelingt mit einem sauren Fließmittel, doch laufen darin 7a und 6 identisch (s. Abb. 4, S.26).

Die bemerkenswerte Stereospezifität bei der Eliminierung auf der Säule wird in Kapitel 3.6.2. interpretiert.

Ein Isomeres von 7 ist dadurch rein erhältlich, daß es aus dem Reaktionsgemisch auskristallisiert. Dieses kristalline Isomere zeigt das chromatographische Verhalten der Fraktion mit $R_f = 0,25$. Es soll im folgenden trotz der oben erwähnten Einschränkung mit 7a gleichgesetzt werden. Mit seiner zunehmenden Kristallisation reichert sich im öligen Rückstand 7b an. Auf diese Weise gelingt nach längerer Kristallisationsdauer durch mechanische Trennung der festen von der öligen Phase folgende Reinigung der beiden Fraktionen: 7a ist frei von 7b, 7b zu etwa 10-20% mit 7a verunreinigt.

Das Massenspektrum von 7a zeigt Abbildung 3.

Die diesem Spektrum zugrundeliegende Fragmentierung (94) entspricht der des später zu behandelnden Sulfons 20 (s. Kap. 3.4.2.).

Die Zuordnung des kristallinen Isomeren erfolgt anhand der NMR-Spektren (s. Kap. 3.1.2.).

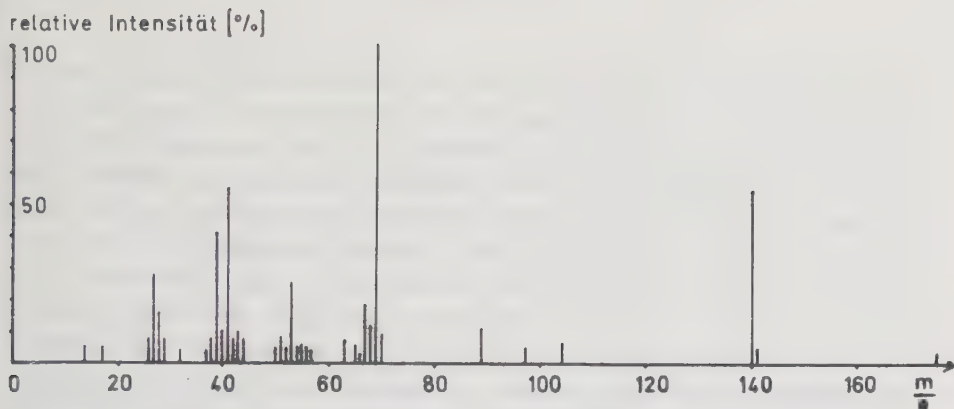


Abb. 3: Massenspektrum des kristallinen Isomeren von 2-(1-Chlor-äthyl)-3-methylsuccinimid (7a); Ionisationsenergie: 75 eV, Proben- = Quellentemperatur = 130°; Werte s. Tab. 9, S. 115.

3.1.2. Zuordnung des kristallinen Isomeren der Chlor-Verbindung 7

Die Zuordnung von 7a basiert auf den Daten des $^1\text{H-NMR}$ -Spektrums (Tabelle 1). Dieses war zuerst in Dimethylsulfoxid (DMSO) aufgenommen worden^{*)}. Später wurde das Spektrum der gleichen Substanz in Chloreform (CDCl_3) aufgenommen, weil die Daten von 7 mit denen des in Kapitel 3.4.3. zu behandelnden Sulfons 20 verglichen und dadurch verbindlichere Aussagen über die Stereochemie der Isomeren erzielt werden sollten. Welchen Einfluß das Lösungsmittel auf die chemische Verschiebung der einzelnen Protonen hat, wird aus Tabelle 1 ersichtlich.

Tabelle 1: Daten der $^1\text{H-NMR}$ -Spektren des kristallinen Isomeren der Chlor-Verbindung, 7a, für (D_6)DMSO und CDCl_3 .

	δ [ppm] DMSO	δ [ppm] CDCl_3		J (Hz) DMSO	J (Hz) CDCl_3
2-H	2.97	2.69	$J_{3',3}$	7.0	7.0
2'-H	4.70	4.69	$J_{2',2}$	3.0	3.0
2'-CH ₃	1.56	1.62	J_{23}	5.5	5.0
3-H	2.81	3.06	$J_{2''2'}$	7.0	7.0
3-CH ₃	1.28	1.42			

*) Die in DMSO aufgenommenen Daten sind in Lit. 96 veröffentlicht. Auf ihnen basierte eine Zuordnung für 7a, die inzwischen durch die für CDCl_3 geltenden Daten überholt ist.

Besonders markant ist der Unterschied zwischen den Lösungsmitteln bei den Daten der beiden Ringprotonen an C-2 und C-3. Während das Resonanzsignal für 2-H in DMSO bei tieferen Feldstärken als das für 3-H erscheint, verhalten sich die δ -Werte der beiden Protonen in CDCl_3 genau in entgegengesetzter Richtung, es erscheint also das Signal für 2-H bei höheren Feldstärken als das für 3-H. Diese vom Lösungsmittel abhängige Inversion der Werte der chemischen Verschiebung ist im Falle der Ringprotonen besonders wesentlich; denn der Vergleich dieser δ -Werte wird bei BODE und BROCKMANN (7) zur Zuordnung von Succinimid-Isomeren zur angularen cis- bzw. trans-Konfiguration herangezogen und soll auch der Bestimmung der relativen Konfiguration zwischen C-2 und C-3 im kristallinen Isomeren von 7 dienen.

Eine weitere spezielle Wirkung des Lösungsmittels wird durch die Verlagerung der δ -Werte der Methylgruppen deutlich. Sowohl das Resonanzsignal für die Methylgruppe an C-2' als auch das Signal für die Methylgruppe an C-3 sind bei Messungen in CDCl_3 gegenüber solchen in DMSO zu tieferen Feldstärken verschoben, d.h. beide Methylgruppen sind in CDCl_3 stärker entschirmt als in DMSO.

Die Lösungsmittelabhängigkeit der NMR-Spektren ist in diesem Ausmaß überraschend. Zunächst ist wahrscheinlich, daß DMSO aufgrund seiner Polarität eine spezifischere Wechselwirkung mit 7 eingeht als CDCl_3 . BERTELLI und GOLINO (5) haben eine ausgeprägte Interaktion zwischen DMSO und Aromaten beschrieben und sie als Funktion der Delokalisierungsenergie der π -Systeme dargestellt. JACKMAN und STERNHELL (49a) beschreiben als typische Lösungsmiteleinflüsse die Bildung von π -Komplexen und magnetische Anisotropieeffekte bei Aromaten. Überträgt man dieses Modell eines Lösungsmiteleinflusses auf das mesomere System der Imidgruppe, so kann man folgern, daß sich in den Daten des in DMSO aufgenommenen Spektrums sowohl inter- wie intramolekulare Einflüsse widerspiegeln, während bei den Daten des in CDCl_3 aufgenommenen Spektrums die Relationen der einzelnen δ -Werte hauptsächlich auf intramolekularen Wechselwirkungen beruhen (vgl. Lit. 49b). Deshalb soll das Chloroform-Spektrum zur Zuordnung von 7a herangezogen werden.

Vergleicht man nun jeweils die beiden Ringprotonen und die beiden Methylgruppen miteinander, so fällt auf, daß das Resonanzsignal für 2-H zu höheren Feldstärken als das von 3-H, das Signal für die Methylgruppe an C-2' zu tieferen Feldstärken als das für die Methylgruppe an C-3 verschoben ist. Es muß also eine entschirmende

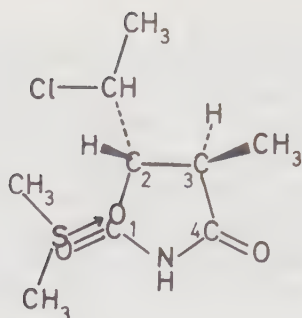
Wirkung der Chloräthylgruppe auf 3-H vorhanden sein, während auf 3-CH₃ keine entschirmende Wirkung beobachtet wird. Man kann dies so interpretieren, daß 3-H sich in die gleiche Richtung aus der Ebene des Molekülfünfringes heraus erstreckt wie die Chloräthylseitenkette, die Ringprotonen also trans-ständig sind.

Damit wird für 7a eine Zuordnung zur trans-Reihe (gemäß der Stellung der beiden Ringprotonen zueinander) bzw. zur threo-Form (gemäß der relativen Konfiguration an C-2 und C-3) wahrscheinlich.

Hält man den für Chloroform erhaltenen Daten die Daten des in DMSO aufgenommenen Spektrums entgegen, so fällt auf, daß drei Resonanzsignale zu etwas höheren Feldstärken verschoben sind, während nur das Signal für 2-H deutlich stärker entschirmt ist. Der Abschirmungseffekt für die meisten Protonen in 7a, der auch bei den Daten von 20a und 20b in DMSO beobachtet wird (vgl. Tabelle 11, S.118), könnte möglicherweise generell der Tatsache zugeschrieben werden, daß die polaren Bereiche im Succinimid mit den polaren Gruppen des Lösungsmittels in Wechselwirkung treten, was zu einer verstärkten Aufenthaltswahrscheinlichkeit der Methylgruppen des Lösungsmittels in der Umgebung des unpolaren Bereichs des Imids führt.

Aus der spezifischen Abweichung von dieser Tendenz bei 2-H kann man einen gezielten Einfluß der Sulfoxidgruppe des Lösungsmittels an der Carbonylgruppe von C-1 ableiten. Dabei ist eine komplexartige Fixierung des Sulfoxid-Sauerstoffes in Höhe von C-1 und des Sulfoxid-Schwefels in Höhe des Carbonylsauerstoffes an C-1 vorstellbar. Diese Fixierung muß auf derjenigen Seite der Ebene des Molekülfünfringes angenommen werden, auf der an C-2 das Proton steht; denn auf der Seite der Chloräthylseitenkette wäre sie sterisch gehindert. An C-4 ist die gleiche Sulfoxid-Fixierung beim trans-Isomeren ebenfalls sterisch gehindert; denn auf der Seite der Methylgruppe engt diese den Platz an C-4 ein, auf der anderen Seite wirkt sich die Chloräthylgruppe an C-2 hinderlich auf eine Sulfoxid-Fixierung an C-4 aus (28).

Diese Interpretation der Entschirmung von 2-H in DMSO steht ebenfalls mit einer trans-Konfiguration von 7a in Einklang. Denn in einer cis-Verbindung läßt sich eine derartige Fixierung von Lösungsmittelmolekülen kaum erklären, fällt dort doch der "Nischen-effekt" einer benachbarten Methylgruppe auf der gleichen Seite der Ringebene weg, so daß 2-H und 3-H äquivalent erscheinen.



28

Andererseits ist damit keineswegs irgendeine Aussage für 7b nahegelegt. Für die angulare Konfiguration von 7b gibt es keine konkreten Anhaltspunkte. Weitere sterische Erkenntnisse liefert jedoch die Eliminierungsreaktion (s. Kap. 3.6.2.).

Gestützt wird die Argumentation einer Sulfoxid-Fixierung an C-1-Carbonyl für 7a durch den analogen Befund (Entschirmung von 2-H) beim DMSO-Spektrum von 20a. Dort ist der Vergleich mit dem Isomeren 20b möglich (vgl. Kap. 3.4.3.).

3.2. Bildung des Thioäthers 8 aus der Chlor-Verbindung 7

Für die Umsetzung von 7 mit Thiolen zu Thioäthern bot sich die Reaktion mit Äthanthiol aus verschiedenen Gründen besonders an:

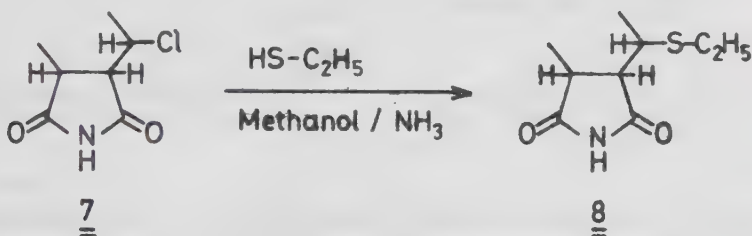
1. Die entstehenden Thioäther versprachen ähnliche chromatographische Eigenschaften zu besitzen wie die übrigen bisher bekannten substituierten Succinimide und konnten daher unter den üblichen Bedingungen gut untersucht werden (Trägermaterial, Fließmittel, Nachweisreaktionen).
2. Man kann Äthanthiol als Flüssigkeit dem gelösten 7 in homogener Phase zur Reaktion zuführen.
3. Die entstehenden Imide hatten als zusätzliche funktionelle Gruppen (zur Imidfunktion) ausschließlich einen Thioäther, so daß sich bei anschließenden Untersuchungen an diesen Verbindungen, insbesondere bei Behandlung mit Chromsäure alle auftretenden Effekte auf die Thioäthergruppierung zurückführen ließen.

Die Reaktion von Äthanthiol (im Überschuß) mit 7 wird in Methanol als Lösungsmittel unter Zusatz von wäßrigem Ammoniak bei RT durchgeführt und liefert quantitativ den zu erwartenden Thioäther 8 (Schema 6). Eine Konkurrenzreaktion von 7 mit Methanol zu den entsprechenden Methyläthern kann nicht beobachtet werden (95). Das läßt

auf die wesentlich höhere nukleophile Kraft der SH- gegenüber der OH-Gruppe schließen.

Beide Stereoisomere 7a und 7b geben die gleiche Reaktion. Eine Auftrennung von 8 in einen länglichen Fleck mit offenbar zwei Bestandteilen gelingt in der DC mit unpolaren Fließmitteln (s. Abb. 6, S. 29). Ob es sich um zwei Isomere handelt, konnte nicht geklärt werden.

Bei der Synthese von 7 war aufgefallen, daß die beiden Isomeren 7a und 7b von den beiden Formen des 2-Äthyliden-3-methylsuccinimids, 5 und 6, in den herkömmlichen Fließmitteln dünnschichtchromatographisch nicht zu unterscheiden waren (vgl. Kap. 3.1.1.). Andererseits war über die Wirkung von Basen auf 7 nichts bekannt. Deshalb war es notwendig, den Mechanismus der in Schema 6 gezeigten Reaktion genauer zu untersuchen.



Schema 6

3.2.1. Eliminierung der Chlor-Verbindung 7 durch Einwirkung von Basen

Zweckmäßigerweise wurde zuerst nach einem Fließmittel gesucht, das die chromatographische Unterscheidung von 7a/7b und 5/6 gestattete. Vergleicht man die polare Chloräthyl-Seitenkette von 7 mit der weniger polaren Äthyliden-Seitenkette von 5/6, so kann man schließen, daß die Acidität bei beiden Imiden verschieden sein und deshalb ein saures Fließmittel zur chromatographischen Trennung führen müsse. Es gelang schließlich, mit einem Gemisch aus Benzol, Dioxan und Eisessig im Verhältnis 100:8:0,3 eine Trennung von 7a und 5 sowie von 7b und 6 herbeizuführen; dabei haben 7a und 6 den gleichen R_F -Wert (sie können in anderen Fließmitteln unterschieden werden, s. Abb. 4a und 4b).

Von Interesse war das Verhalten von 7a und 7b gegen Säuren und Basen. Die Imide wurden je zwei Stunden mit methanolischer Salzsäure bei 50° und mit 2n H₂SO₄ (bzw. Chromsäure) bei 100°, je

20 Minuten mit methanolischer Natronlauge und mit methanolischem Ammoniak (Methanol : Base jeweils 10:1) bei RT behandelt, mit folgendem Ergebnis: Während Säuren auch bei erhöhter Temperatur nur eine geringfügige Eliminierung von 7 bewirken, führen Basen schon bei RT zur quantitativen Eliminierung von HCl (Abb. 4; für 7a auch gaschromatographisch bestimmt).

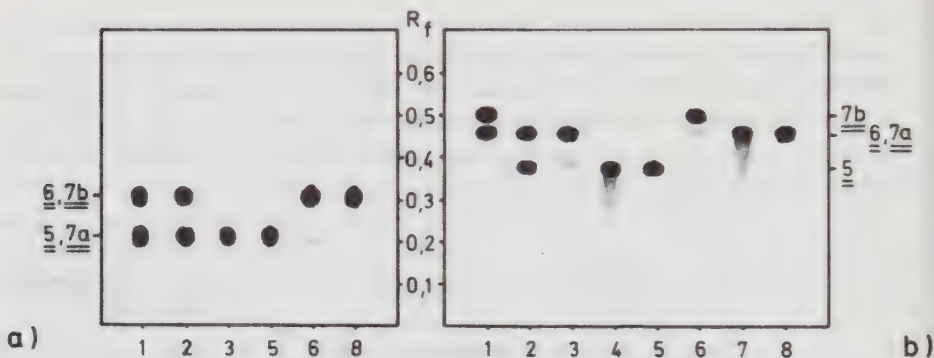


Abb. 4: DC der Eliminierungsreaktionen der beiden Isomeren des Chlor-Imids, 7a und 7b; a) Fließmittel Ia } s.Tab.6,
b) Fließmittel IIc, zweimal } S. 107
Kieselgel GF₂₅₄, Nachweis: Chlor/Benzidin.

- | | |
|--|--|
| 1) Vergleich: <u>7a</u> und <u>7b</u> | 5) <u>7a</u> + 2n NH ₃ /Methanol, RT, 1 h |
| 2) Vergleich: <u>5</u> und <u>6</u> | 6) <u>7b</u> + 2n H ₂ SO ₄ , 100°, 1 h |
| 3) <u>7a</u> + methan. HCl, 50°
oder 2n H ₂ SO ₄ , 100° | 7) <u>7b</u> + 2n NaOH/Methanol, RT,
1 h |
| 4) <u>7a</u> + 2n NaOH/Methanol,
RT, 1 h | 8) <u>7b</u> + 2n NH ₃ /Methanol, RT, 1 h |

Dieser Befund verdient im Hinblick auf die Ergebnisse von CROWELL und HWANG (25) Beachtung, wonach die Eliminierung von β -Chlor-carbonyl-Verbindungen zu α,β -ungesättigten Carbonylverbindungen sowohl säure- wie basen-katalysiert ist, mit graduellen Vorteilen der Basenkatalyse. Die hier bei 7 zu Tage tretende extrem leichte Eliminierbarkeit mit verdünntem Ammoniak bei RT unterscheidet sich eher prinzipiell vom Verhalten gegen Säuren.

Die Eliminierung erfolgt mit außerordentlicher Stereospezifität. 7a eliminiert ausschließlich zu 5, 7b zu 6. Dieses Verhalten war bereits beim Versuch der Isolierung der beiden Isomeren 7a und 7b beobachtet worden (s. S.20).

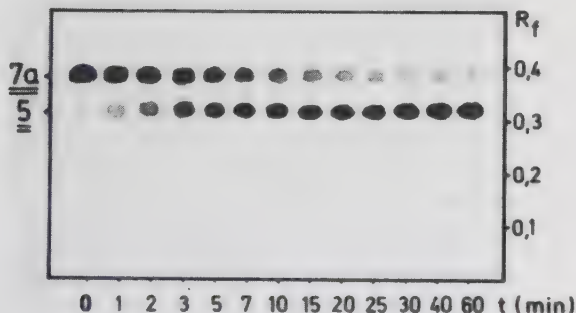
Die optimalen Bedingungen für eine möglichst hohe Ausbeute an 5 und 6 sind bei der Behandlung von 7 mit verdünntem Ammoniak in Methanol gegeben. Die Anwendung von Natronlauge in Methanol führt stets zu kleinen Ausbeuteverlusten, da die Imidfunktion durch stärkere Basen angegriffen wird.

Die Eliminierungsprodukte 5 und 6 wurden getrennt isoliert und charakterisiert. Die Massenspektren von 5 und 6 (GC-MS-Kopplung, s. Tabelle 10, S.116) zeigen die typischen Peakhöheninversionen für die Isomeren (52,53).

Die Geschwindigkeit der Eliminierungsreaktionen von 7a und 7b wurde dünnschichtchromatographisch verfolgt. Der zeitliche Verlauf der Eliminierung von 7a bei der Behandlung mit verdünntem Ammoniak in Methanol ist in Abbildung 5 wiedergegeben.

Abb. 5:

DC der Eliminierung der kristallinen Chlor-Verbindung 7a zu E-2-Äthyliden-3-methylsuccinimid (5) durch 1.3n Ammoniak/Methanol in Abhängigkeit von der Zeit (RT); Bedingungen wie in Abb. 4b.



7a eliminiert nach diesen Versuchen etwa doppelt so schnell wie 7b: Während für 7a die Halbwertszeit bei 5-7 Minuten liegt, beträgt sie für 7b über 10 Minuten.

Die Ammoniak-Konzentration spielt keine entscheidende Rolle. Ein Versuch mit den drei verschiedenen Basenkonzentrationen 6.8, 1.3 und 0.13 n Ammoniak ergab für 6.8 und 1.3 n Ammoniak die gleichen Ausbeuten und Reaktionsgeschwindigkeiten, nur für die verdünnte Basenlösung (0.13 n Ammoniak) eine Verlangsamung der Reaktionsgeschwindigkeit etwa um den Faktor 3.

Vergleicht man die hier ermittelte Reaktionsgeschwindigkeit der Eliminierung von 7 zu 5/6 mit Beobachtungen bei der Umsetzung von 7 mit Äthanthiol im Basischen, so ergibt sich, daß die Eliminierung schneller verläuft als die Bildung von 8 aus 7. Es liegt also nahe, daß bei der Reaktion $\underline{7} \rightarrow \underline{8}$ vor der Bildung des Thioäthers 8 eine Eliminierung von 7 stattfindet.

3.2.2. Addition von Äthanthiol an 2-Äthyliden-3-methylsuccinimid (5/6)

Nachdem die Wirkung von Basen auf 7 gesichert war, konnte man vermuten, daß bei der in Schema 5 gezeigten Reaktion im Anschluß an die Bildung von 5/6 eine Addition von Äthanthiol an C-2' erfolgen muß. Um das zu prüfen, wurde isoliertes 5/6 mit Äthanthiol umgesetzt. Dabei bestätigte sich, daß 5/6 unter der Wirkung von verdünntem Ammoniak in Methanol Äthanthiol an C-2' addiert (Schema 7).

Die Addition erfolgt bei RT nur im basischen Milieu (vgl. Abb. 6). Sie wird stets mit einem Überschuß von Äthanthiol vorgenommen, da bei Gegenwart von Luftsauerstoff die Konkurrenzreaktion des Thiols zum Disulfid zu einer nachweisbaren Verminderung der freien SH-Gruppen führt: Setzt man äquimolare Mengen 5/6 und Äthanthiol ein, so bilden sich mit der Zeit aus dem anfänglich allein vorhandenen Thioäther in einer Rückreaktion wieder meßbare Mengen an 5/6 und - nicht nachgewiesen - vermutlich das Disulfid. Dieser Effekt einer Konkurrenzreaktion wird erheblich stärker bei Verwendung anderer Thiole beobachtet (s. Kap. 3.7.).

Daß die Addition von Äthanthiol an polarisierte Doppelbindungen als Gleichgewichtsreaktion formuliert werden kann, bestätigen neue Untersuchungen von RAULIN und TOUPANCE (75).

Die Tatsache, daß nur an C-2', nicht aber an C-2 addiert wird, spricht für einen nicht-radikalischen, also ionischen Mechanismus. Zur genaueren Analyse des Reaktionstyps wurde die Addition von Äthanthiol sowohl an 5 als auch (zum Vergleich) an 24 bei RT unter vier verschiedenen Bedingungen untersucht: Von zwei Lösungen der beiden Reaktionspartner in neutralem Methanol wurde die eine zwei Stunden im Dunkeln gehalten, die andere in der gleichen Zeit mit UV bestrahlt; analog wurde mit zwei ammoniakalischen Methanollösungen verfahren.

Das Ergebnis zeigt Abbildung 6.

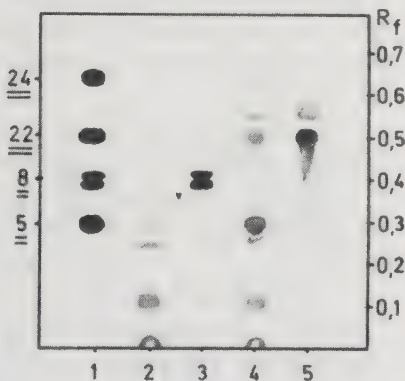
Abb. 6: DC des UV-Einflusses bei der Addition von Äthanthiol (im Überschuß) an die Imide mit exocyclischer (5) und endocyclischer Doppelbindung (24); UV: 240 nm;
Bestr.-dauer: 2 h; methan. Lösung.

Kieselgel GF₂₅₄

Fließmittel Ib, zweimal
(s. Tab.6, S.107)

Nachweis: Chlor/Benzidin

- 1) Vergleich: 5, 8, 22, 24
- 2) - 5) nach Bestrahlung
- 3) 5 + Äthanthiol, pH = 7
- 4) 5 + Äthanthiol, pH = 10
- 5) 24 + Äthanthiol, pH = 7
- 6) 24 + Äthanthiol, pH = 13



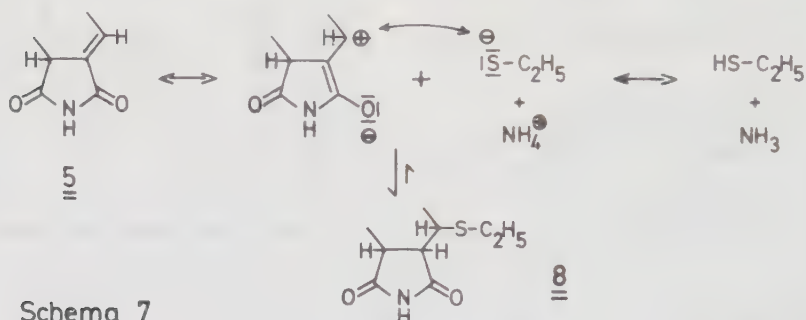
In neutraler Lösung ohne UV-Einwirkung läuft weder bei 5 noch bei 24 eine Addition mit dem Thiol ab. Mit basischem Katalysator verlaufen die Additionen an 5 und 24 unabhängig von einer UV-Bestrahlung glatt.

Ein Unterschied zwischen dem Succinimid 5 und dem Maleinimid 24 zeigt sich jedoch bei UV-Einwirkung in neutraler Lösung: 5 wird in Gegenwart von Äthanthiol weitgehend zerstört (vgl. Stabilität von 5 in Abwesenheit von Thiolen: Kap. 2.3.2.), und das Additionsprodukt 8 läßt sich nicht nachweisen. 24 bildet neben dem Hauptprodukt 5 (vgl. Umwandlung von 24 zu 5 durch UV: Kap. 2.3.2.) mit Äthanthiol deutlich nachweisbar auch das Additionsprodukt 22. Da 8 und 22 bei UV-Einwirkung in neutraler Lösung etwa die gleiche Stabilität aufweisen (s. Kap. 2.3.2.), kann man direkt schließen, daß 8 aus 5 und Äthanthiol durch UV-Bestrahlung nicht entsteht, ein radikalischer Additionsmechanismus also beim Succinimid auch nicht möglich ist. Dagegen ist beim Maleinimid 24 neben dem glatter verlaufenden ionischen Mechanismus auch der radikalische Additionsmechanismus möglich.

Mit diesem Befund steht auch die in Kapitel 2.3.2. beschriebene unterschiedliche Dimerisierungstendenz von 24 und 5 in Einklang.

Daß die Addition nur an C-2' erfolgen kann, geht aus einer Betrachtung der Ladungsverteilung in 5 hervor. Die Äthylidengruppe befindet sich mit der Carbonylgruppe an C-1 in Konjugation und ist daher zu ihr vinylog. Das hat eine Positivierung von C-2' zur

Folge (Schema 7). Dieser Effekt ist wegen der Mesomerie in der Imidfunktion gegenüber einer nicht substituierten α,β -ungesättigten Carbonylverbindung (z.B. Acrolein) stark abgeschwächt. Deshalb ist auch trotz der nukleophilen Kraft von SH-Gruppen die katalytische Wirkung von Basen erforderlich.



Sehr schwierig ist es, den genauen sterischen Verlauf der Addition zu ermitteln, weil eine präparative Auftrennung der beiden Isomeren von 8 nicht gelingt (s. S. 25).

Da jedoch durch nachfolgende Oxidation des Thioäthers zwei gut voneinander trennbare Sulfone entstehen (Kap. 3.4.), ist eine Analyse des sterischen Ablaufs der gesamten Reaktionskette an späterer Stelle möglich (Kap. 3.6.3.).

Ein Vergleich der Reaktion von Schema 6 mit der von Schema 7 vermittelt, daß die zunächst als nukleophile Substitution erscheinende Reaktion 7 $\rightarrow$ 8 aus zwei hintereinandergeschalteten Reaktionsschritten besteht: Auf eine Eliminierung folgt eine nukleophile Addition, und beide Reaktionen sind basenkatalysiert.

3.3. Behandlung des Thioäthers 8 mit Ammoniak

Mit 8 ist ein erstes Modell des Thioäthers, der an Ring I des Chromophors der nativen Biliproteide postuliert wird, synthetisiert.

Wie sich 8 gegenüber Ammoniak in wäßriger oder methanolischer Lösung bei RT verhält, geht bereits aus der Beschreibung der Additionsbedingungen hervor. Es tritt sehr langsam eine Spaltung ein, wobei wieder 5 entsteht. Nach der Standardreaktionszeit von einer Stunde ist 5 wieder gut nachweisbar (5-10%), auch 6 tritt in Spuren

auf ($< 5\%$, bezogen auf 8); nach drei Tagen sind etwa 30% von 8 wieder in 5 umgewandelt. Diese Rückreaktion der Addition ist - gemäß Schema 7 - offensichtlich auf den Entzug von Thiol aus dem Gleichgewicht bei Gegenwart von Luftsauerstoff zurückzuführen. Da die Reaktion in ihrem Ausmaß gering ist, hat sie keine Bedeutung als Spaltungsreaktion des Thioäthers.

Ein ganz anderes Bild ergibt sich, wenn 8 mit einem Gemisch aus wäßrigem NH_3 und DMSO (1:1) gekocht wird. Da ein Gemisch von Basen und DMSO als für Eliminierungen günstig beschrieben wird (2,67), wurde es bei 8 angewandt und die dabei auftretende Eliminierung gaschromatographisch untersucht.

Nach einer Stunde ist der überwiegende Teil von 8 verschwunden, doch auch 5/6 tritt nur in etwa $40\text{--}70\%$ Ausbeute auf. Die Ausbeuten des Eliminierungsproduktes schwanken erheblich, und es ist anhand der Gaschromatogramme ersichtlich, daß die Gesamtmenge an Imiden vermindert wird.

Daraufhin wurde 8 mit verdünntem wäßrigem Ammoniak ohne Zusatz von DMSO gekocht. Es zeigte sich, daß DMSO für die Spaltung des Thioäthers entbehrlich ist, denn die Ausbeuten an 5/6 ($20\text{--}60\%$) liegen in der gleichen Größenordnung wie beim Versuch mit DMSO/NH_3 . Allerdings ist die Tendenz festzustellen, daß wäßriger Ammoniak noch stärker den Imidring selbst angreift, so daß noch etwas größere Schwankungen bei Wiederholungen des gleichen Versuchs auftreten.

Obwohl die Behandlung des Thioäthers mit Ammoniak bei 100° keine schonende Spaltung darstellt, liegen die Ausbeuten des Eliminierungsproduktes 5/6 doch so hoch, daß eine Übertragung dieser Methode auf Biliproteide einen Fortschritt gegenüber den bisherigen Verfahren bringen könnte. Die Verwendung von wäßrigem Ammoniak hat gegenüber der Verwendung eines Gemisches von DMSO/NH_3 den Vorteil, daß das Eliminierungsprodukt aus dem Reaktionsgemisch leichter extrahiert werden kann.

Eine Berücksichtigung der sterischen Verhältnisse an den Imiden war im Rahmen dieser Versuche nicht sinnvoll, da sich bei höheren Temperaturen ohnehin ein Gleichgewicht der beiden isomeren Formen des Eliminierungsproduktes, 5 und 6, einstellt.

Die Ergebnisse der Behandlung von 8 mit Ammoniak sind in Tabelle 5, S.62. mit aufgenommen.

3.4. Behandlung des Thioäthers 8 mit Chromsäure

3.4.1. Chromsäureoxidation des Thioäthers 3 und Vergleich mit anderen Methoden der Thioätheroxidation

Da die Anwendung des Chromsäureabbaus auf Biliproteide zu deren Strukturaufklärung üblich ist, wurde die Wirkung von Chromsäure auf den Thioäther 8 näher untersucht.

Zunächst wurde die Reaktion bei RT durchgeführt:

Frisch hergestelltes 8 wurde in einem Überschuß von 1 proz. Chromsäure (1% CrO_3 in 2n H_2SO_4) gelöst. Nach einer Stunde wurde die Lösung zweimal mit Äthylacetat extrahiert und der Extrakt in der DC untersucht. Dabei war 8 völlig verschwunden, aber auch 5/6 war nicht entstanden. Statt dessen traten zwei Imidfraktionen in gleicher Konzentration neu auf, deren R_f -Werte wesentlich niedriger als die von 8 oder 5/6 waren und nahe beieinander lagen (s. Abb. 11, S.47). Da die Extraktion aus der stark sauren Lösung möglicherweise unvollständig war, wurden in weiteren Versuchen die Chromsäurelösungen vor der Extraktion mit Ammoniak neutralisiert und dann im Perforator je sechs Stunden mit Äthylacetat und mit Chloroform kontinuierlich extrahiert.

In diesen Extrakten trat nun außer den neuen Substanzen wieder 5/6 auf, allerdings in geringerer Konzentration als diese. Da die neu entstandenen Verbindungen wegen ihrer R_f -Werte erheblich polarer schienen als 5/6, wurde eine Trennung durch erneute Verteilung zwischen wäßriger und organischer Phase versucht.

Tatsächlich sammelten sich im Wasser nur die neuen Imide an, die zum Teil auch zusammen mit 5/6 in der organischen Phase zurückblieben. Die wäßrige Phase, die ausschließlich die neuen Imide enthielt, wurde gefriergetrocknet. Vom Lyophilisat wurde ein Massenspektrum aufgenommen.

Darin trat, wenn auch nur in etwa 1 proz. relativer Intensität, ein Massenpeak von 233 auf, der aufgrund der Isotopenverteilung (+234,235) die typischen Merkmale einer Schwefelverbindung aufwies. Dabei konnte es sich nur um das um zwei Sauerstoffatome vermehrte Oxidationsprodukt von 8, das Sulfon 20 handeln (Struktur s. S.15).

Da das Lyophilisat aus einem Gemisch zweier Imidfraktionen bestand, gab es zwei Möglichkeiten: Die Substanzen waren Stereoisomere des Sulfons 20, oder neben dem Sulfon lag das Sulfoxid vor, dessen Massenpeak im MS nicht zu erkennen war. Zur Klärung dieser Frage

mußten beide Imide präparativ aufgetrennt werden (s. Kap. 3.4.2.).

Die Möglichkeit, Thioäther mit Chromsäure zu Sulfonen zu oxidieren, ist bereits lange bekannt (33,57) und auch in neueren Arbeiten beschrieben (62,112). Dennoch muß eine Oxidation in diesem Ausmaß unter so milden Bedingungen überraschen. Die herkömmlichen Methoden zur Oxidation von Thioäthern zu Sulfonen sind die Anwendung von Wasserstoffperoxid in Eisessig (50 proz. Überschuß) (74,114) sowie von Kaliumpermanganat (3 proz. wäßrige Lösung) (8,27). Deshalb wurde in Handversuchen die Identität der Ergebnisse aus den Standardoxidationen und aus der Oxidation mit 1 proz. Chromsäure getestet. Die Versuche zeigen eine gute Übereinstimmung aller Oxidationsreaktionen, denn in allen Fällen treten die zwei gleichen Imidfraktionen auf (Abb. 11, S. 47).

Die Extraktion im Säuren erfaßt alle Imide; zusätzlich nach Neutralisation extrahierte Imide (z.B. 5/6, s. S.32) können auf die Neutralisation der Chromsäurelösung mit Ammoniak zurückgeführt werden.

Auch die Behandlung von 8 mit 1 proz. Chromsäure bei 100° ("hydrolytische Bedingungen") über eine Stunde führt nahezu quantitativ zu den beiden neuen Imidfraktionen. In diesem Fall tritt jedoch das Eliminierungsprodukt 5 in Spuren auf (s. Abb. 11).

3.4.2. Präparative Auftrennung und Charakterisierung der bei Behandlung des Thioäthers 8 mit Chromsäure entstandenen Imidfraktionen

Zur Auftrennung über eine Kieselgel-Säule wird ein Extraktionsgemisch eingesetzt, in dem neben den Oxidationsprodukten 5 und 6 vorliegen. Da die neuen Substanzen im verwendeten Standardfließmittel für Imide niedrige R_f -Werte (0,10 und 0,18) besitzen, gelingt eine sehr gute Trennung dieser zwei Fraktionen voneinander. Nach Elution der Hauptmenge von 5/6 bleibt allerdings im Säuleneluat bis zum Ende der am langsamsten wandernden Substanz eine Spur von 5 erhalten, so daß die vereinigten Eluate der beiden Fraktionen jeweils ganz leicht mit 5 verunreinigt sind. Das kann - ähnlich wie bei der Säulentrennung von 7a und 7b (s. Kap. 3.1.1.) - nur auf eine Eliminierung einer oder beider Imidfraktionen während der Säulentrennung zurückzuführen sein.

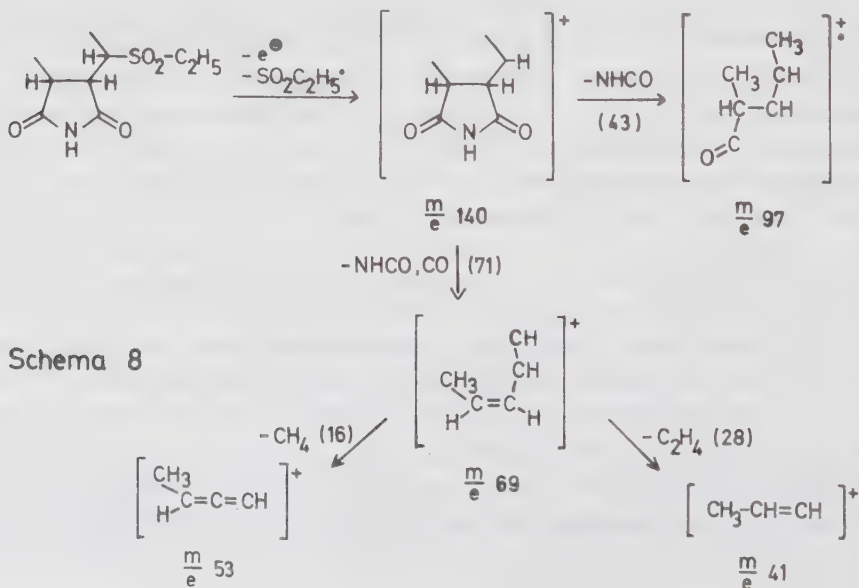
Die Eluate der zwei Imidfraktionen verhalten sich unterschiedlich. Während aus dem eingeeengten Eluat der Fraktion mit $R_f=0,18$ schon bei RT ein kristalliner Niederschlag ausfällt, gelingt eine Kristalli-

sation aus dem konzentrierten Eluat der Fraktion mit $R_f=0,10$ erst nach Änderung der Zusammensetzung des Lösungsmittels (Tetrachlorkohlenstoff > Äthylacetat) und Abkühlen auf -20° .

Die beiden kristallin ausgefallenen Verbindungen unterscheiden sich deutlich im Schmelzpunkt: Die Substanz mit $R_f=0,10$ schmilzt bei 114° , die Verbindung mit $R_f=0,18$ hat einen Schmelzpunkt von 166° . Nach Elementaranalyse und Massenspektrum handelt es sich um zwei Isomere des Sulfons 20. Die Fraktion mit $R_f=0,10$ ist also gemäß der in Kapitel 3.1.1. eingeführten Bezeichnung 20a, die Fraktion mit $R_f=0,18$ ist 20b. Eine sterische Zuordnung von 20a und 20b ergibt sich in den folgenden Kapiteln anhand der NMR-Daten, Röntgenstrukturanalyse und Eliminierungsreaktionen.

Die Massenspektren (Abb. 7) zeigen eine ähnliche Fragmentierung wie das MS von 7a (Abb. 3, S. 21). Das Fragmentierungsschema gehört zu den einfachsten der bei Succinimiden üblichen Abbauege (94) (Schema 8):

Der Molekülpeak weist eine relative Intensität von weniger als einem Prozent auf. Hauptbruchstücke sind m/e 140, m/e 69 und m/e 41. m/e 140 entsteht durch Abspaltung des Sulfonylrestes an C-2', m/e 69 leitet sich aus m/e 140 durch Verlust von NHCO und CO ab, und m/e 41 entsteht wiederum durch Abspaltung eines C_2H_4 -Restes aus m/e 69.



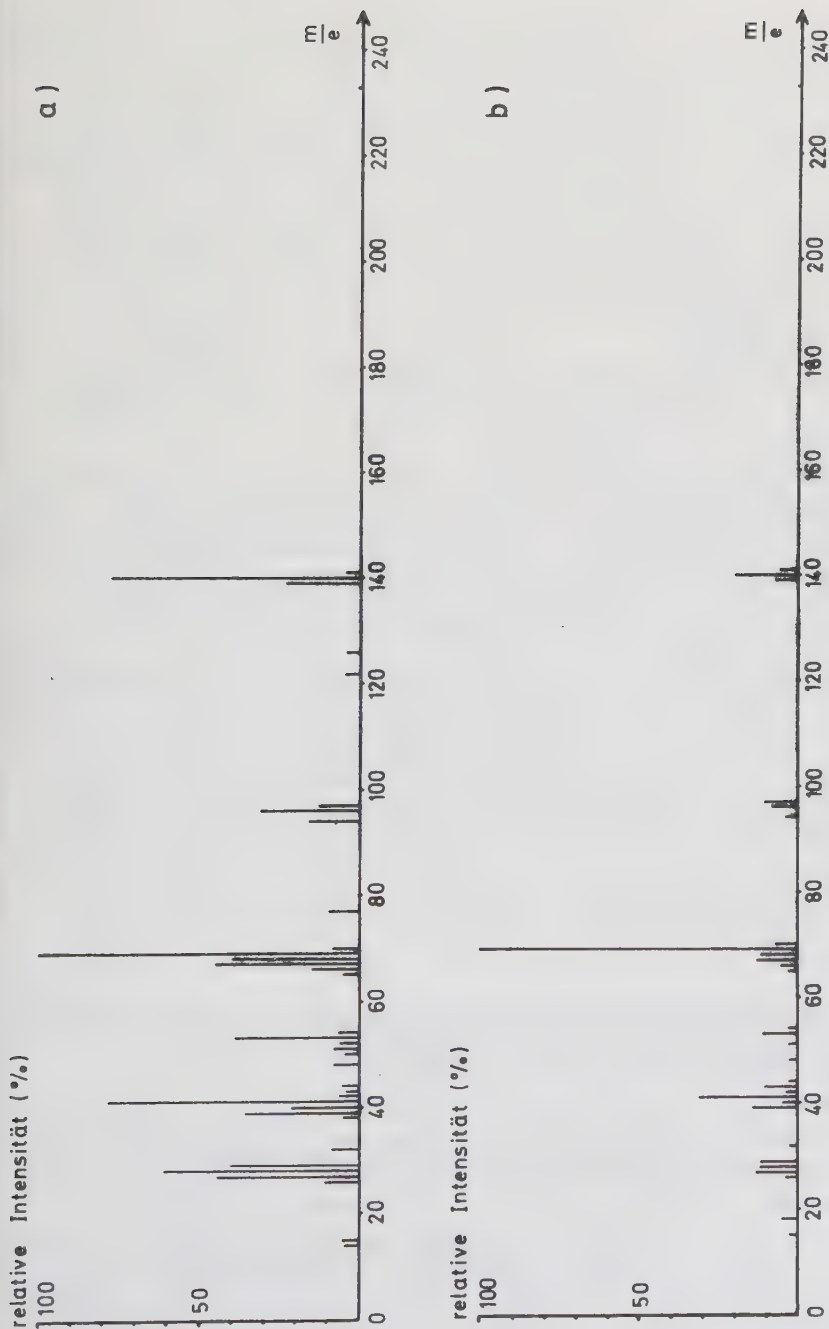


Abb. 7: Massenspektren der Sulfon-Isomeren 20a (a) und 20b (b); Ionisationsenergie: 75 eV; Proben-
temperatur: 140°, Quellentemperatur: 180°; zugehörige Werte s. Tabelle 11, S. 118.

Die Massenspektren von 20a und 20b unterscheiden sich vor allem dadurch, daß 20b nur die drei aufgeführten, 20a dagegen mehr als zehn charakteristische Massenpeaks (rel. Intensität > 20%) aufweist. Das deutet auf eine größere Stabilität von 20b gegenüber 20a hin, was auch im Schmelzpunkt der beiden Verbindungen zum Ausdruck kommt. Die zunächst sehr verschieden aussehenden Massenspektren von 20a und 20b zeigen dann eine große Ähnlichkeit, wenn man den bei 20b dominierenden Massenpeak m/e 69 außer Acht läßt: Für die Relationen unter den übrigen Bruchstücken bei 20a und 20b gibt es eine gute Übereinstimmung.

Eine Inversion von Peakhöhen kann man nur bei m/e 96 und m/e 97 feststellen: m/e 96 tritt bei 20a stärker in Erscheinung als m/e 97, bei 20b ist es umgekehrt.

Die IR-Spektren von 20a und 20b (Abb. 8) zeigen die charakteristischen Absorptionsbanden für substituierte Succinimide (3): U.a. bei 3250 (N-H), 1710 und 1770 cm^{-1} für die CO-NH-CO-Gruppierung, sowie bei 2940 und 2985 cm^{-1} für die C-H-Valenzschwingung der Methylgruppen. Ebenso ist die für die -SO₂-Gruppe typische Bande bei 1315 cm^{-1} vorhanden.

Im Fingerprintbereich der Gerüstschwingungen weisen die Spektren für 20a und 20b erwartungsgemäß Unterschiede auf. Einige für substituierte Succinimide typische Banden (1450, 1340, 1180 cm^{-1}) sind bei den beiden Isomeren sowohl in ihrer Lage als auch in ihrer Ausprägung verschieden. Interessanterweise ist die Absorptionsbande für -SO₂- bei 1315 cm^{-1} , die durch keine für Succinimide typische Bande überlagert wird - was der Vergleich mit IR-Spektren anderer Succinimide zeigt - bei 20a viel deutlicher ausgeprägt als bei 20b.

3.4.3. Interpretation der Protonenkernresonanzspektren der Sulfonisomeren 20a und 20b; sterische Aspekte (I)

Eine Zuordnung von 20a und 20b zu bestimmten relativen Konfigurationen konnte man von der Interpretation der ¹H-NMR-Spektren, die in Abb. 9 wiedergegeben sind, erwarten. Dabei wurden wieder die für das Lösungsmittel CDCl₃ gültigen Daten herangezogen; die Daten für das Lösungsmittel DMSO, das allgemein für sterische Zuordnungen weniger geeignet ist (49b), ergeben die gleichen Relationen zwischen 20a und 20b (Tabelle 11, S.118). Auf die in Kapitel 3.1.2. aufgestellte Hypothese eines spezifischen Einflusses von DMSO bei trans-Konfiguration wird am Schluß dieses Kapitels eingegangen.

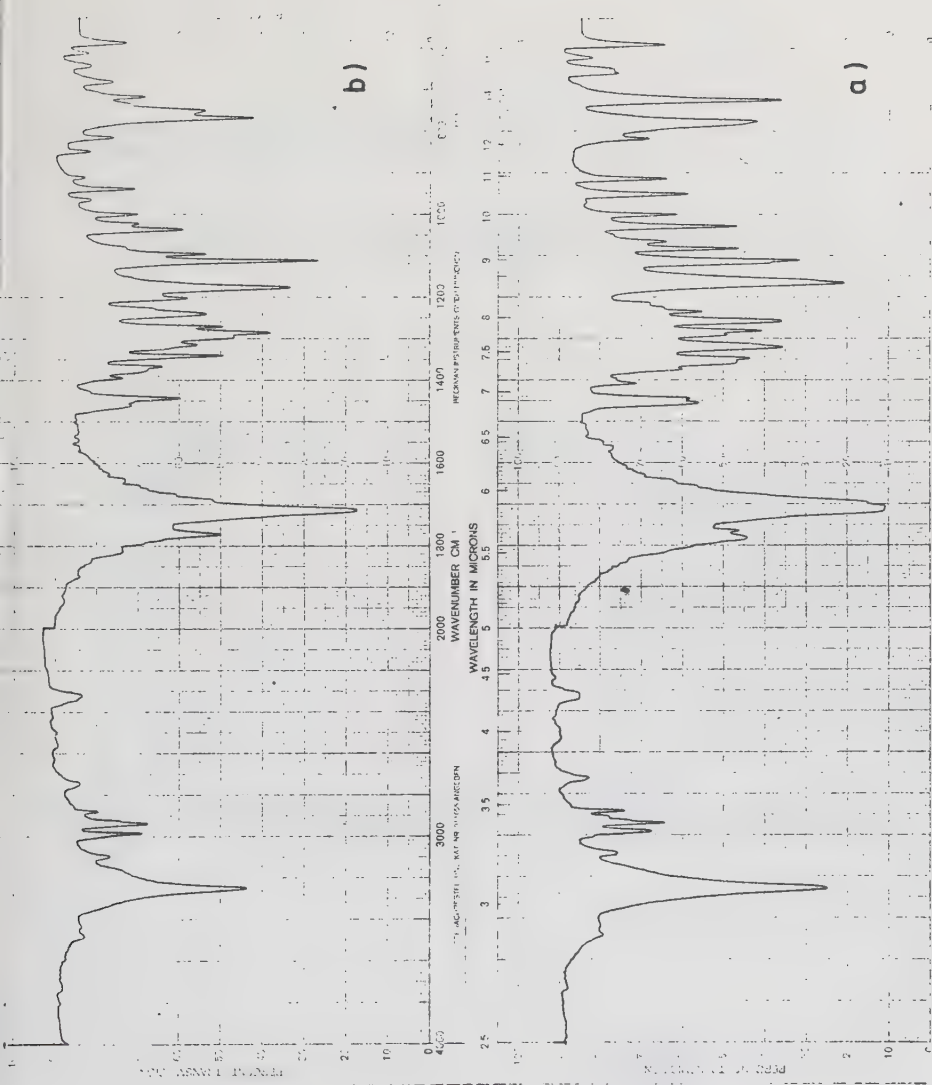
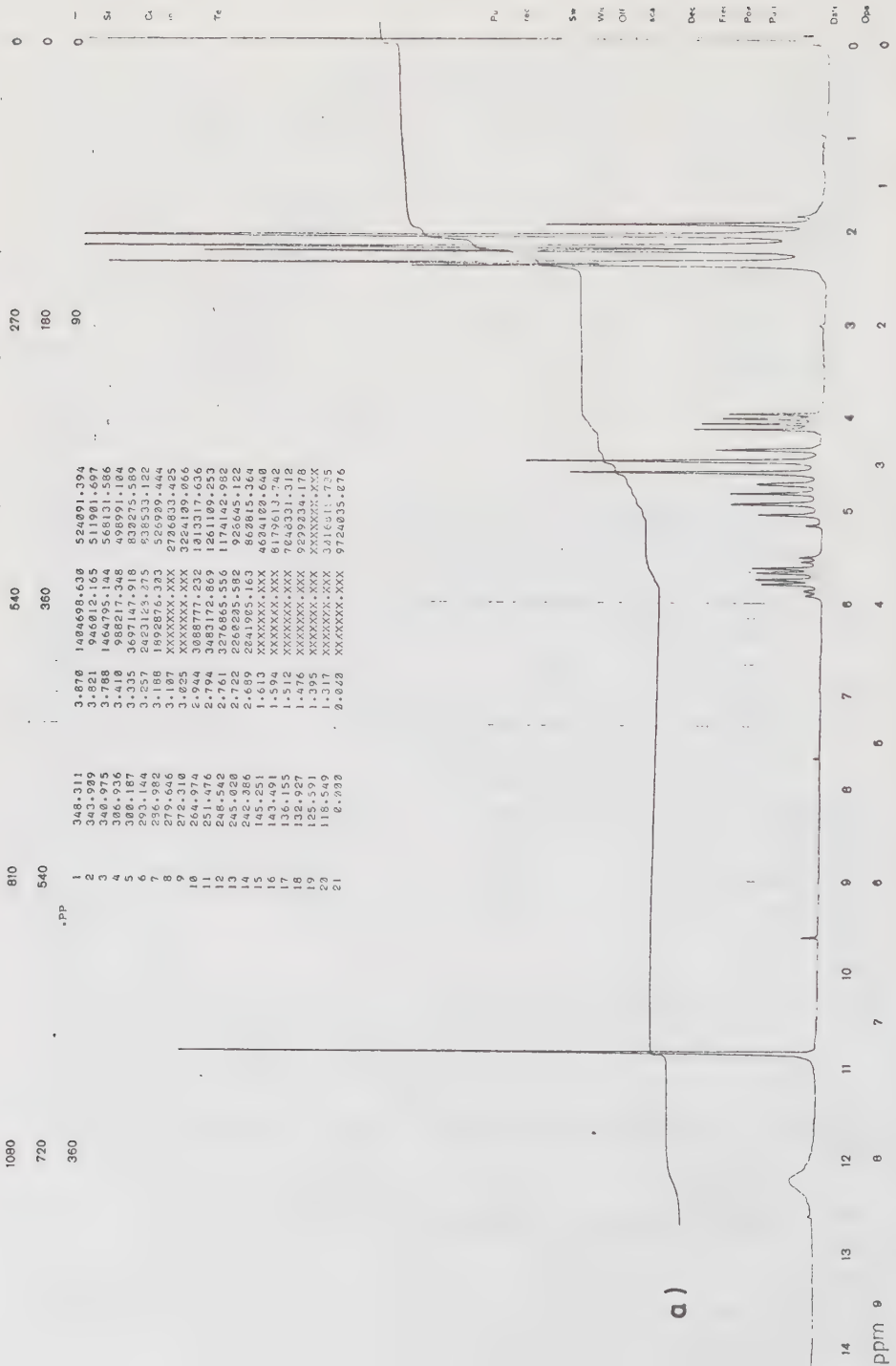


Abb. 8: IR-Spektren der Sulfon-Isomeren 20a und 20b;

a) 20a

b) 20b

Zugehörige Werte s. Tabelle 11, S. 118



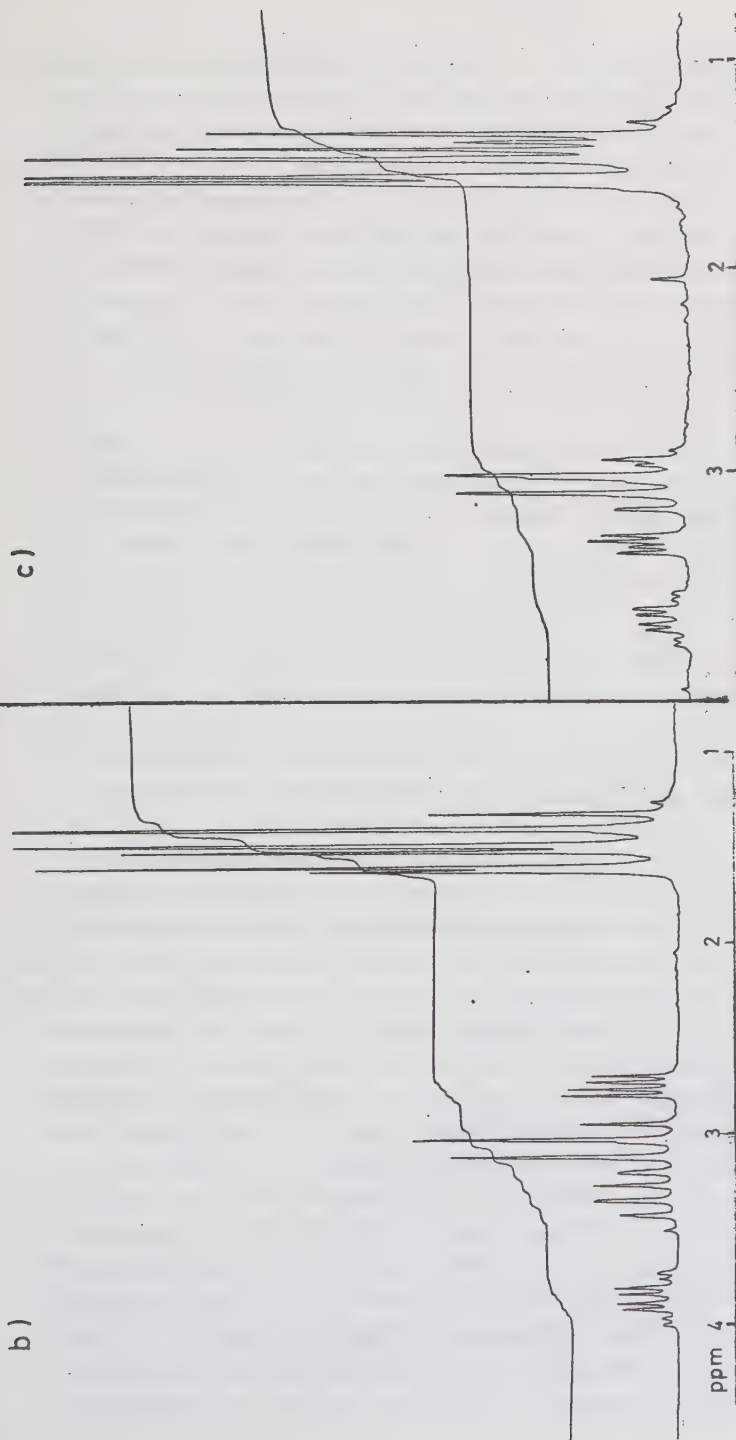


Abb. 9: ^1H -NMR-Spektren der Sulfon-Isomeren $\underline{\underline{20a}}$ und $\underline{\underline{20b}}$, aufgenommen in CDCl_3 ; Werte s. Tab. 11, S. 118; Peaks bei 1.61 und 7.23 ppm sind auf Wasser-Spuren zurückzuführen.

a) Spektrum von $\underline{\underline{20a}}$ b) Ausschnitt des Spektrums von $\underline{\underline{20a}}$ (gedehnt)

c) Ausschnitt des Spektrums von $\underline{\underline{20b}}$ (gedehnt)

Die Kopplungskonstanten für die beiden Ringprotonen, die im Falle der cis-trans-Isomerie üblicherweise zur Zuordnung herangezogen werden, weisen keinen signifikanten Unterschied auf; auch die übrigen Kopplungen sind in beiden Isomeren fast gleich.

Da sich jedoch die Werte der chemischen Verschiebung der einzelnen Protonen sowie Methylgruppen bei 20a und 20b deutlich unterscheiden, sollen diese als Interpretationsgrundlage dienen.

Nun ergeben sich für die auffallenden Inversionen der chemischen Verschiebungen bei 2-H und 3-H einerseits und bei 2'-CH₃ und 3-CH₃ andererseits im Prinzip zwei Deutungsmöglichkeiten:

I.

Die naheliegendere Deutung zielt auf eine angulare cis-trans-Isomerie und entspricht der Argumentation, die von BODE und BROCKMANN (7) für das allerdings kleinere und übersichtlichere 2-Äthyl-3-methylsuccinimid (42, s.S.101) verwendet wurde:

Steht die Methylgruppe an C-3 auf der gleichen Seite der Ebene des Molekülfünfringes wie die Sulfonyläthylgruppe, also in cis-Position, so muß durch die abschirmende Wirkung der Sulfongruppe auf die Methylgruppe das Resonanzsignal für 3-CH₃ bei tieferen Feldstärken auftreten als im Falle einer trans-Stellung der beiden Substituenten. 20b hat das Signal für 3-CH₃ bei tieferen Feldstärken (δ = 1.50 ppm) als 20a (δ = 1.44 ppm). Demzufolge wäre 20b cis-, 20a trans-konfiguriert.

Noch deutlicher sind die Verhältnisse bei den Ringprotonen.

Steht 3-H auf der gleichen Seite der Ringebene wie die Sulfonyläthylgruppe, also in trans-Position zu 2-H, so ist es stärker abgeschirmt, als wenn es in bezug auf die Sulfonyläthylgruppe auf der anderen Seite der Ringebene steht. So hat 3-H in 20a einen δ -Wert von 3.33 ppm, in 20b einen δ -Wert von 3.04 ppm. Das Ringproton 2-H ist bei cis-Stellung zu 3-H weniger abgeschirmt, als wenn es mit der Methylgruppe an C-3 auf der gleichen Seite der Ringebene steht. Entsprechend liegt das Signal für 2-H in 20a bei höheren Feldstärken (δ = 2.74 ppm) als das in 20b (δ = 3.36 ppm).

Schließlich kann auch die auffallende Verschiebung des Signals für 2'-CH₃ zu höheren Feldstärken bei 20b (δ = 1.36 gegenüber 1.55 ppm bei 20a) im Sinne der cis-trans-Isomerie interpretiert werden: Eine Abschirmung von 2'-CH₃ ist bei cis-Stellung von 3-CH₃ eher möglich als bei trans-Stellung.

Die δ -Werte von α -CH₂ und β -CH₃ sind in 20a und 20b nicht signifikant unterschieden.

II.

Nun zeigt jedoch der Bau von Molekülmodellen, insbesondere mit Hilfe von Kalotten, daß auch eine andere als die cis-trans-Isomerie für 20a und 20b gelten kann. Aus Kalottenmodellen ist ersichtlich:

1. Die cis-Konfiguration zwischen C-2 und C-3 ist sterisch in jedem Fall behindert, d.h. es läßt sich für 20 überhaupt kein spannungsfreies Kalottenmodell mit cis-Konfiguration bauen.
2. Dadurch, daß die Sulfonyläthylgruppe relativ voluminös ist, ist in einer cis-Verbindung, gleich welcher relativen Konfiguration an C-2/C-2', stets die freie Drehbarkeit um die Achse C-2/C-2' aufgehoben. Auf diese Weise lassen sich vier separate Konformationen postulieren, die sich nicht ineinander umwandeln lassen sollten. Und zwar läßt sich für jede der beiden möglichen Konfigurationen an C-2/C-2' je eine fixierte trans- und cis-Position von 2'-SO₂-R zu 2-H darstellen; die NMR-Spektren der Konformeren sollten sich in jedem Fall voneinander unterscheiden (s. Tabelle 2, S. 43).
3. Wegen der großen Raumerfüllung des Substituenten an C-2' in 20 lassen sich sogar für die angulare (C-2/C-3) trans-Konfiguration Behinderungen der freien Rotation um die Achse C-2/C-2' postulieren. Dies hätte wiederum verschiedene begünstigte Einstellungsmöglichkeiten zur Folge.

Nach dem Kalottenmodell kann jedoch bei angularer trans-Konfiguration unabhängig von der relativen Konfiguration an C-2/C-2' die Behinderung der Drehbarkeit um die Achse C-2/C-2' im Gegensatz zur cis-Konfiguration nicht so ausgeprägt sein, daß verschiedene separate Zustände ohne wechselseitigen Übergang im gelösten Zustand zu erklären wären. Andererseits sind offensichtlich bestimmte Konformationen energetisch bevorzugt. Und zwar gibt es im Prinzip zwei Einstellungen des Substituenten an C-2: eine, in der 2'-SO₂-R und 2-H in bezug auf die Achse C-2/C-2' trans-ständig sind und eine mit cis-Stellung von 2'-SO₂-R zu 2-H. Dabei erscheint die Konformation mit cis-Stellung von 2'-SO₂-R und 2-H wiederum gegenüber der entsprechenden trans-Stellung wegen der freieren Rotation von 2'-SO₂-R begünstigt. Betrachtet man die Konformationen für beide möglichen relativen Konfigurationen an C-2/C-2', so ergibt sich eine weitere Einschränkung. Um dies näher zu erläutern, wird hier folgende Definition der relativen Konfiguration an C-2/C-2' eingeführt:

Die relative Konfiguration, bei der beide absoluten Konfigurationen an C-2 und C-2' gleich sind (S,S oder R,R), sei Typ α , und entsprechend sei die relative Konfiguration mit unterschiedlichen absoluten Konfigurationen an C-2 und C-2' (S,R oder R,S) Typ β .

Nun sollte für Typ α die in bezug auf 2'-SO₂-R begünstigte Konformation, also die cis-Stellung von 2'-SO₂-R zu 2-H, wegen der dann sterisch beeengten Position von 2'-CH₃ wieder weniger günstig sein als die trans-Stellung von 2'-SO₂-R zu 2-H, in der zwar 2'-SO₂-R nicht so frei rotieren kann, dafür aber 2'-CH₃ eine maximale Beweglichkeit besitzt.

Aus dieser Betrachtung folgt, daß die relative Konfiguration an C-2/C-2' vom Typ α bevorzugt in der Konformation vorliegt, in der 2'-SO₂-R und 2-H trans-ständig ist (Konformation I), und daß die relative Konfiguration vom Typ β bevorzugt die durch cis-Stellung von 2'-SO₂-R und 2-H gekennzeichnete Konformation (II) einnimmt.

Mit dieser lediglich durch den Wechsel der relativen Konfiguration zwischen C-2 und C-2' bewirkten Konformationsänderung ist - wie erwähnt - nicht notwendigerweise eine Fixierung der Achse C-2/C-2' zu fordern (die ja auch nach dem Kalottenmodell nicht gegeben ist), sondern die Drehung dieser C-C-Einfachbindung nur insofern als dynamisch zu sehen, als für die beiden postulierten Konformationen eine gegenüber anderen Einstellungen erhöhte Aufenthaltswahrscheinlichkeit gegeben ist, d.h. daß sie sich über das Integral der Zeit am häufigsten einstellen.

Die NMR-Daten für 20a und 20b sind also nach der Aussage von Kalottenmodellen nicht nur auf eine pauschale cis-trans-Isomerie zu untersuchen, was demzufolge nur bei kleinen Substituenten eines fixierten Fünfringsystems sinnvoll erscheint, sondern müssen auf ihre Übereinstimmung mit zwei der sechs möglichen (4 cis- und 2 trans-) Konformationen geprüft werden.

Da es nach den Kalottenmodellen praktisch auszuschließen ist, daß beide Isomere, 20a und 20b, cis-konfiguriert sind, soll für wenigstens eines der beiden Isomeren eine trans-Konfiguration vorausgesetzt werden. Es stellt sich also die Aufgabe, für die NMR-Daten sowohl von 20a als auch von 20b abwechselnd eine der beiden möglichen trans-Konformationen anzunehmen und dann die Daten des jeweiligen anderen Isomeren auf ihre Übereinstimmung mit den fünf

übrigen Konformationen zu untersuchen. Methodisch bedeutet dies, daß die abschirmenden und entschirmenden Effekte in den betrachteten Konformationen und die daraus resultierenden Verschiebungen der Resonanzsignale abgeschätzt und mit den NMR-Daten von 20a und 20b verglichen werden.

Eine Übersicht dieser Vergleiche zeigt Tabelle 2.

Tabelle 2: Vergleich der ^1H -NMR-Daten der Sulfon-Isomeren 20a und 20b (in CDCl_3) mit Konformationen, die aufgrund von Kalottenmodellen unterschieden werden können; je ein Isomeres wird als angular-trans-konfiguriert angenommen (Konformation I oder II); die Übereinstimmung der NMR-Daten des jeweils anderen Isomeren mit den übrigen fünf Konformationen wird geprüft. Konformations-Zuordnung des zweiten Isomeren (in bezug auf das angenommene erste Isomere): + = möglich, (+) = mit Einschränkung möglich, - = nicht möglich

rel. Konfig. C-2/C-3	trans		cis			
Konformations-Nr. rel. Konfig. C-2/C-2' Stellg. von 2'-SO ₂ -R/2-H	I α trans	II β cis	III β trans	IV β cis	V α trans	VI α cis
<u>20a</u> : angenommen als	<u>20b</u> : Konformations-Zuordnung					
Konformation I	<u>20a</u>	+	+	+	+	+
Konformation II	-	<u>20a</u>	-	(+)	-	(+)
<u>20b</u> : angenommen als	<u>20a</u> : Konformations-Zuordnung					
Konformation I	<u>20b</u>	-	-	-	-	-
Konformation II	+	<u>20b</u>	(+)	-	(+)	-

Danach scheidet lediglich die Konformation I für 20b aus, weil dann die Daten für 20a zu keiner anderen Konformation mehr passen; dagegen läßt sich für die übrigen Konformations-Annahmen (20a = I oder II, 20b = II) stets eine gute bis mäßige Übereinstimmung mit weiteren isomeren Konformationen finden. So ist es nicht möglich, unter der Annahme von Konformation I für 20a die richtige Konformation für 20b anzugeben, weil dann die Daten von 20b mit allen fünf übrigen Konformationen in Einklang stehen.

Nimmt man allerdings für 20b überhaupt nur eine angulare trans-

Konfiguration an, so folgt aus den NMR-Daten und Tabelle 2, daß dann für 20b die Konformation II und wahrscheinlich für 20a die Konformation I (also ebenfalls trans-Konfiguration) gilt.

Es zeigt sich also, daß die NMR-Daten dann, wenn 20b auf anderem Weg exakt zugeordnet werden kann, auch für 20a eine Aussage erlauben, daß sie aber umgekehrt für 20b mehrere Möglichkeiten offenlassen, wenn nur die Konformation von 20a bekannt ist.

Einen Hinweis auf das Vorliegen zweier trans-Verbindungen könnte die Tatsache darstellen, daß die Kopplungskonstante J_{23} bei 20a und 20b sehr ähnlich ist, da eine vicinale cis- von einer vicinalen trans-Kopplung meist um einige Hertz abweicht; allerdings muß man die Signifikanz von Kopplungskonstanten sehr vorsichtig beurteilen.

Vergleicht man die NMR-Daten für CDCl_3 und DMSO, so zeigt sich 2-H von 20a (wie schon bei 7a) in DMSO gegenüber CDCl_3 entschirmt. Interessanterweise kann man diese Verschiebung zu tieferen Feldstärken nun bei 20b nicht beobachten. Dieser Befund kann in jedem Fall mit dem in Kapitel 3.1.2. dargestellten Modell einer Sulfoxid-Fixierung an C-1-Carbonyl korreliert werden:

Ist 20a trans- und 20b cis-konfiguriert, so ist nur für 20a ein derartiger Lösungsmittelleffekt zu erwarten (vgl. Kap. 3.1.2.). Sind beide Isomeren trans-konfiguriert, so ist bei der für 20b postulierten Konformation die Möglichkeit einer solchen Sulfoxid-Fixierung aufgrund der dann störenden Position der Sulfongruppe an C-2' gegenüber der Konformation von 20a sicher eingeschränkt.

3.4.4. Röntgenstrukturanalyse des Sulfonisomeren 20b *)

Da die genauen sterischen Verhältnisse in 20a und 20b wegen der Konsequenzen für die Biliproteide von Interesse waren, wurde eine Röntgenstrukturanalyse von der besser kristallisierenden Verbindung 20b veranlaßt. Sie ergab u.a. zweifelsfrei, daß 20b im Kristall die in Abbildung 10 dargestellte Konformation zukommt, mithin trans-konfiguriert ist.

Die Konformation entspricht der in Tabelle 2 mit II bezeichneten. In ihr liegt also die relative Konfiguration an C-2/C-2' vom Typ B vor und der Substituent 2'-SO₂-R befindet sich in bezug auf die Achse C-2/C-2' zu 2-H in cis-Stellung.

*) Die Röntgenstrukturanalyse wurde von Herrn Dr. LOTTER, MPI für Biochemie in Martinsried, durchgeführt.

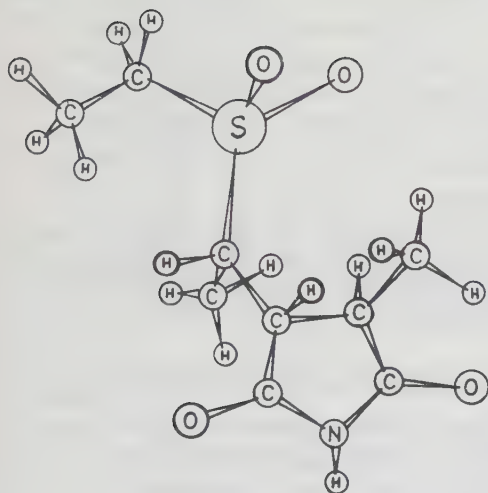


Abb.10a: Konfiguration und im Kristall vorliegende Konformation des Sulfons 20b, nach Daten der von G.LOTTER durchgeführten Röntgenstrukturanalyse (Prospekt bei Zeichnung und Kalottenmodell identisch).

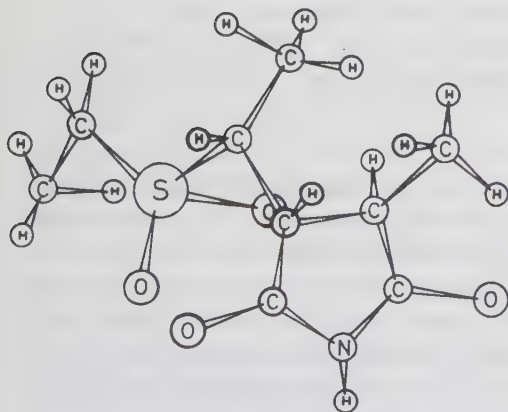


Abb.10b: Konfiguration und Konformation des Sulfons 20a, wie sie aus den NMR-Daten abgeleitet wurden (Prospekt bei Zeichnung und Kalottenmodell identisch).

Die Zuordnung von 20b zur trans-Reihe aufgrund der Röntgenstrukturanalyse läßt nun in Verbindung mit den Aussagen der NMR-Daten (s. Kap. 3.4.3.) für 20a ebenfalls die trans-Konfiguration wahrscheinlich erscheinen. Denn aus Tabelle 2 folgt, daß zu einer Konformation II für 20b am besten die Konformation I für 20a paßt, während die beiden cis-Konformationen III und V sich nur mäßig mit den Daten in Einklang bringen lassen.

Aus den Daten der Röntgenstrukturanalyse und der NMR-Spektren ist somit für 20a eine trans/ α -Konfiguration, für 20b auch in Lösung eine trans/ β -Konfiguration nahegelegt.

3.5. Behandlung des Sulfons 20 mit Ammoniak und Chromsäure

Sowohl die Beimengung von 5 zu jedem der Isomeren von 20 bei der Säulenelution (Kap. 3.4.2.) als auch die Zunahme von 5 bei der Neutralisation der Chromsäurelösung mit Ammoniak (Kap. 3.4.1.) ließen auf eine leichte Eliminierbarkeit des Sulfons 20 - ähnlich wie bei 7 - schließen. Deshalb wurde das Verhalten von 20a und 20b gegenüber Ammoniak näher untersucht. (Die Anwendung stärkerer Basen war schon in Kap. 3.2.1. als weniger spezifisch erkannt worden.) Außerdem interessierte das Verhalten der beiden Sulfon-Isomeren gegen Chromsäure unter hydrolytischen Bedingungen.

20a und 20b wurden getrennt jeweils eine Stunde mit Ammoniak bei RT und bei 100° sowie mit Chromsäure bei 100° behandelt. Die entstandenen Imide wurden anschließend aus saurer Lösung extrahiert. Die Dünnschichtchromatographie dieser Versuche ist in Abbildung 11 wiedergegeben.

Läßt man zunächst die stereospezifischen Besonderheiten der Eliminierungen außer acht, so fällt allgemein die deutlich gesteigerte Eliminierbarkeit des Sulfons 20 gegenüber dem Thioäther 8 bei RT auf. Sulfone sind gegen Basen empfindlich (27,110), vor allem wenn die bei einer Eliminierung entstehende Doppelbindung so durch das Molekül stabilisiert ist wie im Fall des Eliminierungsproduktes 5. Auf diesen Aspekt soll später im Rahmen der Modellbetrachtungen für die Biliproteide noch einmal eingegangen werden.

Keine Eliminierung zeigen 20a und 20b bei der Einwirkung von Chromsäure bei 100°. Dies ist ein Unterschied zum Verhalten des Thioäthers 8, der bei Behandlung mit Chromsäure bei 100° bis zu 5% eliminiert. Das bedeutet, daß eine Eliminierung nur als geringfügige Nebenreaktion bei der Oxidation des Thioäthers unter hydro-

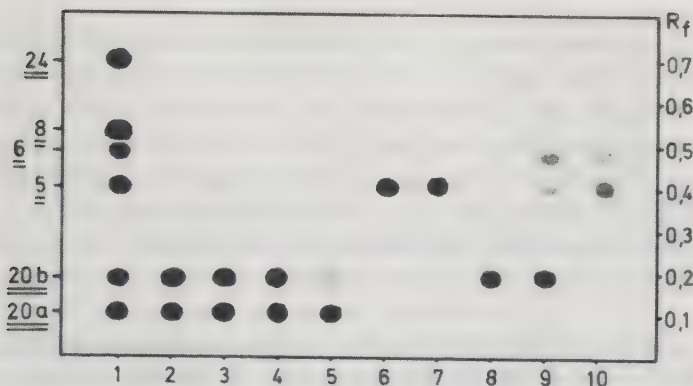


Abb. 11: DC der Oxidation des Thioäthers 8 und der Reaktion der Sulfon-Isomeren 20a und 20b. Reaktionslösungen: 1 proz. $\text{KMnO}_4/2\text{n}$ Essigsäure, 1 proz. $\text{CrO}_3/2\text{n}$ H_2SO_4 ; 2n wäßriger Ammoniak. Reaktionszeit: 1 h. DC-Bedingungen wie bei Abb. 2, S. 16.

- | | |
|--|----------------------------------|
| 1) Vergleich: <u>5</u> , <u>6</u> , <u>8</u> , <u>20a</u> , <u>20b</u> , <u>24</u> | 6) <u>20a</u> + Ammoniak, RT |
| 2) <u>8</u> + Chromsäure, RT | 7) <u>20a</u> + Ammoniak, 100° |
| 3) <u>8</u> + Chromsäure, 100° | 8) <u>20b</u> + Chromsäure, 100° |
| 4) <u>8</u> + Permanganat, RT | 9) <u>20b</u> + Ammoniak, RT |
| 5) <u>20a</u> + Chromsäure, 100° | 10) <u>20b</u> + Ammoniak, 100° |

lytischen Bedingungen auftreten kann; sobald der Thioäther jedoch oxidiert ist, kann auch eine Hydrolyse bei 100° die Bindung an C-2' nicht mehr spalten.

Eine bemerkenswerte Besonderheit zeigt 20a bei Einwirkung von heisser Chromsäure: Die Verbindung isomerisiert in geringem Ausmaß, aber gut nachweisbar, zu 20b. Diese Isomerisierung ist in umgekehrter Richtung nicht zu beobachten. 20b bleibt unter hydrolytischen Bedingungen stabil.

3.5.1. Auftrennung, Charakterisierung und quantitative Bestimmung der Eliminierungsprodukte

Zur näheren Charakterisierung der bei Behandlung mit Ammoniak entstandenen Imide wurde eine säulenchromatographische Auftrennung der Reaktionsprodukte vorgenommen.

Die Behandlung von 20a mit Ammoniak bei RT führt hauptsächlich zu

5, welches durch MS (Tabelle 14, S.123) identifiziert werden konnte. Daneben gibt es nur Spuren eines anderen Imides, das nach den chromatographischen Eigenschaften 6 sein dürfte. Demgegenüber liefert die Ammoniak-Behandlung von 20b bei RT neben unverändertem 20b, das bei Einengen des Eluats wieder kristallin ausfällt, als Eliminierungsprodukte 5 und 6 im Verhältnis von etwa 1:3. Dieses unterschiedliche Eliminierungsverhalten der beiden Isomeren wird durch die quantitative Untersuchung im GC verdeutlicht (siehe unten).

Bei 100° ist die Eliminierbarkeit von 20b offenbar gesteigert, das Isomere bleibt nach der Eliminierung nur in Spuren nachweisbar. Bei den beiden Sulfonen 20a und 20b ist nun 5 bevorzugtes Eliminierungsprodukt (s. Abb. 11).

Die Tatsache, daß aus 20b durch Ammoniak-Behandlung bei RT mehr 6, bei 100° jedoch mehr 5 entsteht, läßt auf eine temperaturabhängige Gleichgewichtseinstellung zwischen 5 und 6 schließen.

Wegen der Bedeutung dieser Eliminierungsreaktion als Modellreaktion für Biliproteide war eine quantitative Untersuchung der entstehenden Eliminierungsprodukte in der Gaschromatographie von Interesse. Zu diesem Zweck wurden alle in Abbildung 11 gezeigten Eliminierungsreaktionen im quantitativen Maßstab durchgeführt, dazu die Eliminierung des Sulfon-Gemisches. Die Sulfone selbst sind unter den verwendeten Bedingungen der GC nicht zu bestimmen, da sie sich auf der Säule z.T. zersetzen.

Tabelle 3 gibt die Ergebnisse der GC-Untersuchung wieder.

Tabelle 3: Quantitative Bestimmung der Eliminierungsprodukte 5 und 6 in der GC bei der Eliminierung der Sulfon-Isomeren 20a und 20b mit 2n wäßrigem Ammoniak (1 h); Ausbeuten von 5 und 6 in %. Als Vergleich diente eine definierte Standardlösung von 5.

Zur Elimin. eingesetzt	<u>20a</u>		<u>20b</u>		<u>20a</u> : <u>20b</u> = 1:1	
Elimin.-prod.	<u>5</u>	<u>6</u>	<u>5</u>	<u>6</u>	<u>5</u>	<u>6</u>
NH ₃ , RT	>90	<5	<5	5-10	45-50	5-10
NH ₃ , 100°	40-70	<5	10-20	~ 5	50-80	~ 5

Aus der Tabelle ist zu entnehmen, daß die Eliminierungen bei RT wesentlich stereospezifischer verlaufen als bei 100°. Vor allem sind die einzelnen Resultate der Eliminierung bei RT reproduzierbar, während die Mengen der Eliminierungsprodukte bei heißer Eliminierung von Versuch zu Versuch z.T. erheblich schwanken; das kann auf die Instabilität des Imidringes unter diesen Bedingungen geschoben werden (vgl. Kap. 3.3.): So läßt sich auch nach Behandlung von reinem 5 mit Ammoniak bei 100° das eingesetzte Imid im GC oft nur noch zu weniger als 50% nachweisen.

Die Ergebnisse, die bei der Eliminierung des Isomerengemisches im Verhältnis von 1:1 erzielt wurden, entsprechen im wesentlichen der Addition der Ergebnisse bei den einzelnen Isomeren. Diese Tatsache kann als Kontrolle des konstanten Reaktionsverhaltens der Verbindungen verstanden werden.

Ein wichtiges Resultat der quantitativen Untersuchung ist die gegensätzliche Eliminierungstendenz von 20a und 20b. Während 20a fast quantitativ eliminiert, bleibt 20b unter den gleichen Bedingungen fast ganz erhalten. Hierin unterscheidet sich die Modellverbindung 20 deutlich von dem in Kapitel 3.1. und 3.2. beschriebenen 7.

In bezug auf die Stereospezifität der Eliminierung ist 20 der Verbindung 7 ähnlich: Aus 20a entsteht das Eliminierungsprodukt 5, aus 20b wird bevorzugt 6 freigesetzt. In beiden Fällen tritt das jeweils andere Isomere des Eliminierungsproduktes nur in Spuren auf; die Eliminierung von 20b verläuft sterisch weniger einheitlich als die von 7b.

3.6. Sterische Aspekte (II)

3.6.1. Mechanismus der Eliminierungsreaktion

Die Daten der Eliminierung von 7a und 7b sowie von 20a und 20b geben in folgender Weise Aufschlüsse über den Mechanismus der Reaktion:

1. Die Stereospezifität der Eliminierung bei RT (wegen der Einschränkung für 20b s. Punkt 3) bedeutet für den Reaktionsmechanismus, daß keine monomolekulare, also nur eine bimolekulare Eliminierung unter den angewandten milden Bedingungen in Frage kommt. Die E₂-Eliminierungen verlaufen meist in der Weise, daß sich die austretenden Gruppen in trans-Stellung zueinander

befinden (73).

2. Die geringe Eliminierungsrate von 20b läßt sich erklären, wenn man als Reaktionsmechanismus eine sterisch einheitlich verlaufende trans-Eliminierung annimmt: Durch die Methylgruppe an C-3 ist die freie Drehbarkeit des Substituenten an C-2 in 20b und damit die für eine reibungslose Eliminierung notwendige Einstellung der austretenden Gruppen - Sulfonylgruppe an C-2', H an C-2 - in trans-Position (vgl. Schema 9, S.52) erschwert. Daraus könnte die nur etwa 10%ige Eliminierungsrate von 20b resultieren (bei 7a und 7b ist die trans-Stellung von 2-H und Cl - unabhängig von der exakten sterischen Konfiguration der Isomeren - wegen der geringeren Raumerfüllung von Chlor möglich).
3. Auch die im Vergleich zu 7b geringere Stereospezifität bei der Eliminierung von 20b kann auf die sterische Hinderung der optimalen Eliminierungsposition zurückgeführt werden. Befindet sich die austretende Sulfonylgruppe bei der Eliminierung nicht in einer trans-Stellung von 180° zu 2-H, sondern in einem Winkel von $<180^\circ$ so ist mit zunehmender Abweichung von der exakten trans-Position ein steigender Anteil des Eliminierungsproduktes 5 neben 6 zu erwarten. Dies läßt sich aus Molekülmodellen ableiten.

Als Reaktionsmechanismus ist also die einheitliche trans-Eliminierung sehr wahrscheinlich.

3.6.2. Interpretation der Eliminierungsergebnisse

Die synthetisierten Modellverbindungen haben je drei asymmetrische Zentren an C-2, C-2' und C-3, so daß insgesamt vier Diastereomerenpaare mit unterschiedlichen relativen Konfigurationen, d.h. unter Berücksichtigung der optischen Antipoden acht verschiedene Isomere postuliert werden können.

In den vier Typen von Isomeren, die sich durch Kombination der relativen Konfigurationen an C-2/C-3 mit den relativen Konfigurationen an C-2/C-2' darstellen lassen, sind auch die Beziehungen der absoluten Konfigurationen zueinander festgelegt. Für die relative Konfiguration an C-2/C-2' war diese Zuordnung durch die Definition bereits erfolgt (s. S.42); bei der relativen Konfiguration an C-2/C-3 gilt für die trans- die S,S- bzw. R,R-Konfiguration, für die cis- die S,R- bzw. R,S-Konfiguration.

Es muß hier darauf hingewiesen werden, daß die angegebenen Bezeichnungen für die absoluten Konfigurationen nur für Modellimide gelten,

die an C-2' ein Heteroatom mit einer Ordnungszahl > 16 aufweisen (19). Sobald anstelle von Chlor bei 7 und Schwefel bei 8, 9 und 20 Sauerstoff tritt (z.B. bei 27), gilt für die absolute Konfiguration an C-2 gerade die entgegengesetzte Bezeichnung (S statt R bzw. R statt S).

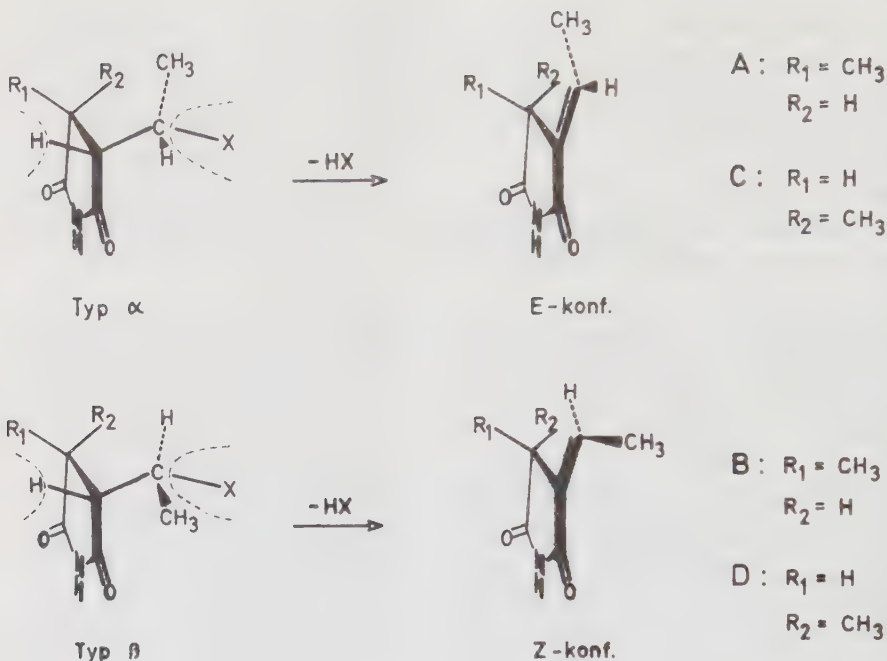
Tabelle 4 gibt die Definition der vier Typen von Isomeren, die mit den Buchstaben A - D bezeichnet werden, in bezug auf die relativen und absoluten Konfigurationen wieder.

Tabelle 4: Definition der vier Typen von Isomeren (Diastereomerenpaare) bei Modellimidin, die an C-2' ein Heteroatom mit einer Ordnungszahl > 16 aufweisen.

Isomeren- typ	rel.Konf. C-2/C-3	rel.Konf. C-2/C-2'	mögliche absolute Konf. an C-Atom		
			2'	2	3
A	trans	Typ α	R S	R S	R S
B	trans	Typ β	R S	S R	S R
C	cis	Typ α	R S	R S	S R
D	cis	Typ β	R S	S R	R S

Die in Abschnitt 3.6.1. abgeleitete trans-Eliminierung hat nun folgende Konsequenzen:

Aus allen Isomeren von 7 und 20, welche eine relative Konfiguration an C-2/C-2' vom Typ α aufweisen, sollte als Eliminierungsprodukt E-konfiguriertes 2-Äthyliden-3-methylsuccinimid (5), aus Isomeren mit Konfigurationen vom Typ β Z-konfiguriertes 6 erhalten werden. Dies geht aus der näheren Betrachtung der Modellisomere A - D hervor: Bei Modell A wie bei Modell C, die eine relative Konfiguration an C-2/C-2' vom Typ α aufweisen, führt eine Anordnung der Äthylseitenkette an C-2 in der Weise, daß die austretenden Gruppen - x an C-2', H an C-2 - sich in trans-Position zueinander befinden, zum Eliminierungsprodukt 5, bei Modell B und D führt der gleiche Mechanismus entsprechend zu 6 (Schema 9, es ist jeweils nur ein Antipode dargestellt).



Schema 9

Die Eliminierungsergebnisse führen somit zu der Aussage, daß 7a und 20a jeweils an C-2/C-2' die relativen Konfigurationen vom Typ α , 7b und 20b die relativen Konfigurationen vom Typ β aufweisen. Im Isomeren 20b ist durch die Röntgenstrukturanalyse diese Konfiguration nachgewiesen (vgl. Abb. 10).

3.6.3. Prüfung auf sterische Effekte bei der Addition und Konfigurationsumkehr bei der Chromsäureoxidation

Da bei der Synthese von 20 als Ausgangsmaterial 5/6 eingesetzt wird und die Thioladdition und Chromsäureoxidation eine übersichtliche Reaktionskette darstellen, sollten durch Einsetzen von sterisch einheitlichem 5 bzw. 6 einerseits und Prüfung auf Konfigurationsumkehr durch Chromsäureoxidation in deuterierter Schwefelsäure andererseits Aussagen über den Mechanismus des Reaktionsablaufs und damit auch wieder über die sterischen Verhältnisse in 20a und 20b zu erzielen sein.

Bei der Synthese von 20, bei der die Isomeren 20a und 20b mengen-

gleich angefallen waren, war ein Gemisch von $\underline{5}/\underline{6}$ eingesetzt worden, in dem $\underline{5}$ deutlich überwog (etwa 10:1). Wenn man nun annimmt, daß bei der Thioladdition ein sterischer Einfluß von Nachbargruppen zum Angriff des Thiolatanions von nur einer Seite der Doppelbindung führt, so müßte man aus dem Auftreten zweier Isomere in gleichen Mengen auf eine beidseitige Sekundäraddition des Wasserstoffs an C-2 schließen, was eine cis-trans-Isomerie bedeuten würde.

Unterstellt man z.B. eine sterische Hinderung durch die Methylgruppe an C-3, d.h. daß der Angriff des Thiolatanions an C-2' nur von der der Methylgruppe gegenüberliegenden Seite der Doppelbindung erfolgt und daß das kleinere Proton dann an C-2 von beiden Seiten angreift, so sollten aus $\underline{5}$ ausschließlich die Isomere vom Typ A und D entstehen, dagegen sollten aus $\underline{6}$ nur die beiden Stereoisomere vom Typ B und C gebildet werden.

Die Isomere $\underline{5}$ und $\underline{6}$ wurden getrennt mit Äthanthiol und anschließend mit Chromsäure umgesetzt. Die DC des Reaktionsablaufs ist in Abbildung 12 wiedergegeben.

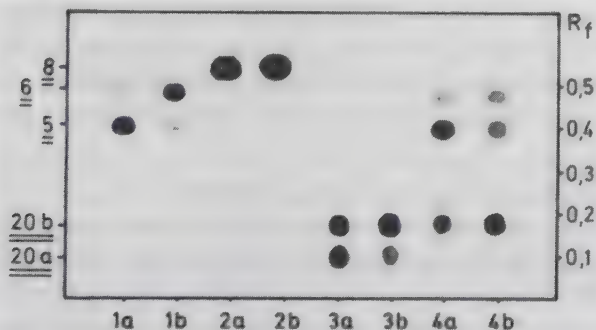


Abb. 12: DC der Reaktionsfolge von Thioladdition, Chromsäureoxidation und Eliminierung bei den getrennten Isomeren von 2-Äthyliden-3-methylsuccinimid, $\underline{5}$ und $\underline{6}$.

DC-Bedingungen wie bei Abb. 2, S. 16.

- | | | |
|----------------------------------|--|--|
| 1a) Eingesetztes $\underline{5}$ | 4a)=3a) | } + konz.NH ₃ bis pH10
RT, 1 h |
| 1b) Eingesetztes $\underline{6}$ | 4b)=3b) | |
| 2a) $\underline{5}+$ | } Äthanthiol(Überschuß) | |
| 2b) $\underline{6}+$ | | in 2n methan. NH ₃ |
| 3a)=2a), Lösg. eingeengt | } + 1%CrO ₃ /2n H ₂ SO ₄
RT, 1 h | |
| 3b)=2b), Lösg. eingeengt | | |

Die Sulfone, die beim Einsetzen von 6 als Startmaterial erhalten werden, lassen sich dünnschichtchromatographisch nicht von den Sulfonen unterscheiden, deren Ausgangsverbindung 5 ist.

Wird nun mit Ammoniak bei RT eliminiert, so zeigen sich keine Unterschiede zwischen den aus 5 und den aus 6 erhaltenen Isomeren: Sowohl einzeln als auch im Gemisch eliminiert jeweils die Fraktion mit $R_f=0,10$ quantitativ zu 5 und die Fraktion mit $R_f=0,18$ in geringerem Maß zu 6 und Spuren von 5 (Abb. 12).

Schließlich wurden die Isomeren isoliert und NMR-Spektren der besser kristallisierenden Verbindungen aufgenommen. Die Spektren von 20b aus 5 und 20b aus 6 sind identisch.

Zur Absicherung wurden die Schmelzpunkte untersucht. 20b aus 5 schmilzt wie 20b aus 6 bei 166° . Auch ein Mischschmelzpunkt deutet auf keinerlei Abweichung der beiden auf verschiedenem Weg gewonnenen Isomeren voneinander hin. Ebenso schmilzt 20a aus 5 wie 20a aus 6 bei 114° .

Es ist theoretisch vorstellbar, daß in den Säuleneluaten pro Fraktion mehrere Isomere vorliegen. Dagegen spricht, daß nach Entnahme der Kristalle, die ja jeweils nur ein Isomeres darstellen, stets die gleichen Isomeren nachkristallisieren. Außerdem wurden die Eliminierungsversuche mit zuvor zur Trockne eingeeengten Teilen der Eluate durchgeführt, so daß zumindest das Auftreten von Isomeren mit anderem Eliminierungsverhalten ausgeschlossen werden kann.

Man kann aus den Versuchen folgendes schließen:

Für die Tatsache, daß aus 5 und 6 jeweils nur zwei und in beiden Fällen die gleichen Isomeren gebildet werden, kann nicht die zweiseitige Protonaddition an C-2 bei einseitiger Thioladdition an C-2' verantwortlich sein (da dann 6 andere Isomeren liefern müßte als 5), sondern es muß vielmehr eine zweiseitige Thioladdition an C-2' mit nachfolgender einseitiger Addition des Protons angenommen werden. So ist auch der sterische Effekt zu erklären, der bei diesem Versuch mit getrenntem Ausgangsmaterial zu beobachten und gut reproduzierbar ist: Während die aus 5 erhaltenen Sulfone 20a und 20b in äquimolaren Mengen anfallen, entsteht beim Einsatz von 6 das Produkt 20b in vier- bis fünfmal so großer Menge wie das Isomere 20a. Aus Molekülmodellen ist ersichtlich, daß bei der Addition an die Äthylidenbindung (von der Seite, auf der $3-CH_3$ aus der Ringebene herausragt) eine sterische Hinderung durch $3-CH_3$ für 6 eher

zu erwarten ist als für 5. Das hätte bei der Thioladdition an 6 zur Folge, daß die Addition des Thiolatanions an C-2' bevorzugt trans-ständig zu der des Protons an C-2 erfolgt, was bei Z-konfigurierter Äthylidenbindung zur relativen Konfiguration des Typs β führen muß. Dies steht in Einklang mit dem verstärkten Auftreten von 20b, für das ja durch die Röntgenstrukturanalyse die Konfiguration von Typ β an C-2/C-2' nachgewiesen ist (vgl. S.44).

Schließlich war die Frage zu prüfen, ob bei der Chromsäureoxidation eine Konfigurationsumkehr an einem der asymmetrischen Zentren erfolgt, wodurch der eigentliche Additionsmechanismus überlagert würde. Denn es war denkbar, daß der Thioäther 8 in vier Isomeren vorliegt und erst durch die Oxidation des Thioäthers und den damit voluminöser werdenden Rest an C-2' im Säuren eine Isomerisierung zu zwei sterisch weniger gehinderten Isomeren eintritt.

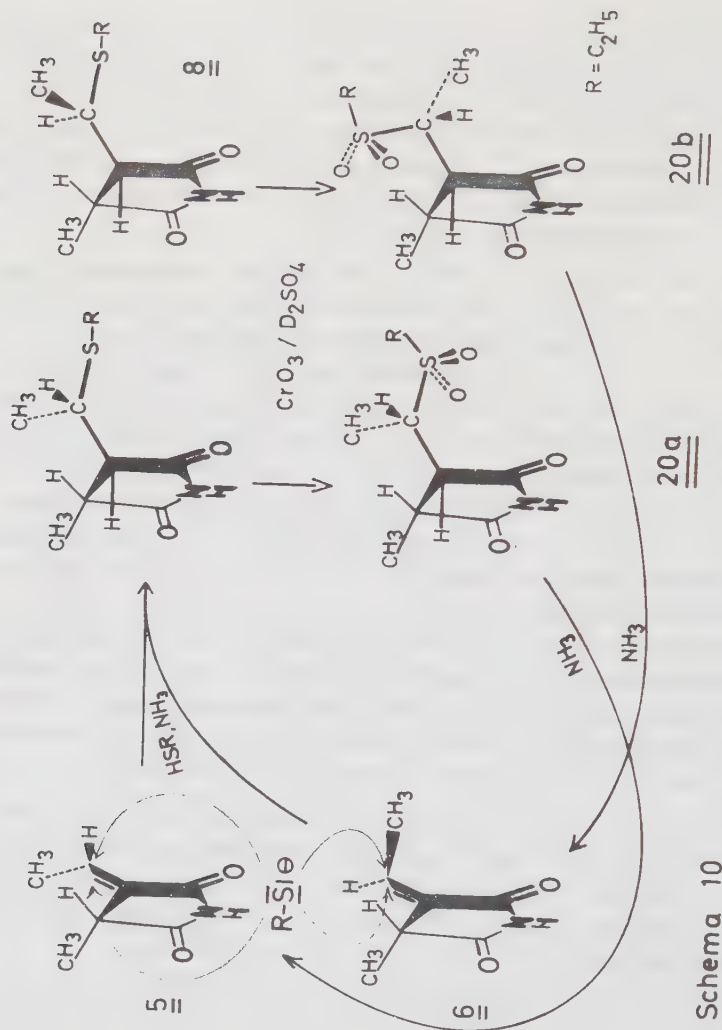
Der Thioäther 8 (Isomerengemisch, dargestellt aus einem Gemisch von 5 und 6) wurde mit CrO_3 in $2\text{n D}_2\text{SO}_4$ umgesetzt. Dort, wo eine Konfigurationsumkehr erfolgt, würde man unter diesen Bedingungen eine Deuterierung erwarten.

In den NMR-Spektren der isolierten Sulfone 20a und 20b treten jedoch alle Protonenresonanzsignale unvermindert an gleicher Stelle auf wie bei den Vergleichssubstanzen. Ein Protonenaustausch (und damit eine Konfigurationsumkehr) findet also während der Oxidation von 8 zu 20 nicht statt.

Unter Berücksichtigung aller Daten (Röntgenstrukturanalyse, NMR-Spektren, Eliminierungsreaktionen, Versuche zum Additionsmechanismus und zur Konfigurationsumkehr) kann man als sehr wahrscheinlich annehmen, daß 20a dem Modelltyp A (trans/ α) und 20b dem Modelltyp B (trans/ β) entspricht.

Der sterische Ablauf der Reaktionskette von 5/6 zu 20a und 20b und durch Eliminierung zurück zu 5/6 ist in Schema 10 zum Ausdruck gebracht (wobei wieder nur jeweils ein Antipode dargestellt ist).

Daß 8 viel schwieriger in zwei Komponenten unterschiedlicher relativer Konfiguration an C-2/C-2' zu trennen ist als 20, läßt sich mit der im Vergleich zum Sulfon geringeren Raumerfüllung des Thioäther-Schwefels erklären. Auch dies ist letztlich ein Argument dafür, daß keine cis-trans-Isomerie nach Thioladdition vorliegt, denn auch bei kleinen Substituenten am Ring sollte die cis- von der trans-Konfiguration chromatographisch gut zu trennen sein (vgl. S.19 und Lit. 12).



3.7. Übertragung der Reaktionsfolge auf andere Thiole

Mit den Verbindungen 7, 8 und 20 sind Modellimide synthetisiert worden, deren Modellcharakter für Ring I der Biliproteid-Chromophore sich hauptsächlich auf die funktionelle Gruppe an C-2' der Imidstruktur bezieht. Es können damit grundsätzliche Erkenntnisse über die Reaktivität dieser funktionellen Gruppe und die Stereochemie der Succinimide gewonnen werden.

Die Modellversuche sollen nun auf Strukturen übertragen werden, die eine nähere Beziehung zu den Strukturverhältnissen in den Bili-proteiden aufweisen. Da dort bei einer Thioätherverknüpfung von Ring I des Chromophors mit dem Protein als bindende Aminosäure vor allem Cystein in Frage kommt, was auch in einem Fall nachge-wiesen wurde (56), liegt die Untersuchung von Imiden nahe, die an C-2' mit Cystein bzw. Cysteinderivaten verknüpft sind. Dabei soll die Addition der SH-Gruppe von Cystein und dessen Derivaten an 5, die Oxidation des entstehenden Thioäthers mit Chromsäure sowie das Eliminierungsverhalten des Thioäthers und des oxidierten Thio-äthers im Vordergrund der Untersuchungen stehen.

3.7.1. Addition von Cystein an 2-Äthyliden-3-methylsuccinimid (5/6)

Cystein kann mit 5/6 in homogener Phase reagieren, wenn 5/6 in Metha-nol und Cystein in Wasser gelöst und unter Ammoniak-Zugabe zu-sammengebracht werden. Es entsteht in schneller Reaktion das Cystein-Addukt von 5/6, 9 (Schema 11).

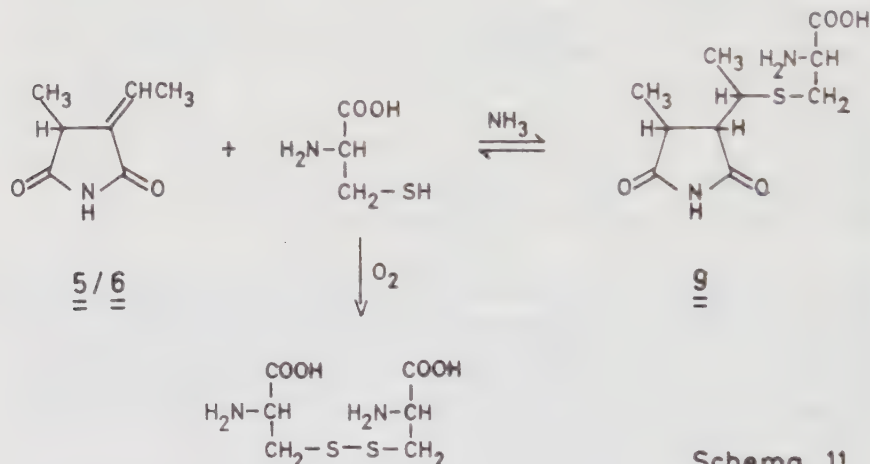
Wie schon bei der Addition von Äthanthiol an 5/6 wurden die opti-malen pH-Bedingungen ermittelt. Es zeigte sich, daß in saurer Lö-sung fast keine Addition, dafür umso mehr Oxidation von Cystein zu Cystin erfolgt; in neutraler, ammoniakalischer und stark basischer Lösung verläuft die Addition mit unterschiedlichen Geschwindig-keiten, in stark basischer Lösung tritt wieder die teilweise Zer-störung des Imidsystems auf. In neutraler Lösung ist das Optimum der Addition erst nach 1-2 Tagen erreicht, so daß die üblichen Additionsbedingungen mit Ammoniak als Katalysator auch hier in der Folge angewandt wurden.

Der schon bei der Bildung des Thioäthers 8 aus 5/6 und Äthanthiol zu beobachtende Effekt eines Zerfalls des Adduktes (s. Schema 7), wobei wieder 5/6 entsteht, ist bei der Addition von Cystein an 5/6 so stark ausgeprägt, daß die Isolierung von 9 auf größte Schwierig-keiten stößt. Der Grund dafür ist die außerordentlich leichte Oxi-dierbarkeit von Cystein in der Reaktionslösung durch Luftsauer-stoff, welche durch das nach 1-2 Stunden beginnende Ausfallen des Oxidationsproduktes Cystin augenfällig wird.*)

Die schnelle Zersetzung des Adduktes 9 auch bei größerem Überschuß von Cystein ist ein Hinweis darauf, daß die Addition wieder als

*) Auf die Ausschaltung des Oxidationseffektes durch Arbeiten unter Stickstoff wurde verzichtet, da Additions- und Eliminierungsver-halten des Thiols im Vordergrund des Interesses standen.

Gleichgewichtsreaktion angesehen werden kann; denn zur Bildung von Cystin aus 5 bedarf es eines mit 5 im Gleichgewicht befindlichen Cysteins. Dies ist in Schema 11 zum Ausdruck gebracht (vgl. Schema 7)



Schema 11

Bestätigt wird das in Schema 11 dargestellte Gleichgewicht, wenn man die Addition mit wechselnden Mengen der Reaktionspartner untersucht. Bei Einsatz von äquivalenten Mengen an 5/6 und Cystein erscheint in der Reaktionslösung nach einer Stunde ein Gemisch von 5/6, Cystein und 9; nach längerer Zeit nimmt 5/6 zu, Cystein und 9 ab, und Cystin tritt immer stärker auf. Setzt man einen $1\frac{1}{2}$ fachen Überschuß Cystein ein, so ist nach einer Stunde kein 5, sondern nur Cystein und 9 nachzuweisen; doch schon nach vier Stunden taucht auch hier wieder 5 und Cystin im Reaktionsgemisch auf, 9 nimmt wieder ab (Abbildung 13).

9 tritt als länglicher Fleck in der DC auf. Die Trennung in zwei Bestandteile des Flecks ist von Versuch zu Versuch unterschiedlich ausgeprägt. Die wiederholten Bemühungen, 9 über eine Säule präparativ zu isolieren, scheiterten an der Zersetzlichkeit der Verbindung.

So kann man auch nicht aus dem Erscheinungsbild von 9 in der DC auf Isomere 9a und 9b schließen. Aus Gründen der Analogie kann man aber annehmen, daß möglicherweise wie bei 7, 8 und 20, auch bei 9 zwei Isomere auftreten.

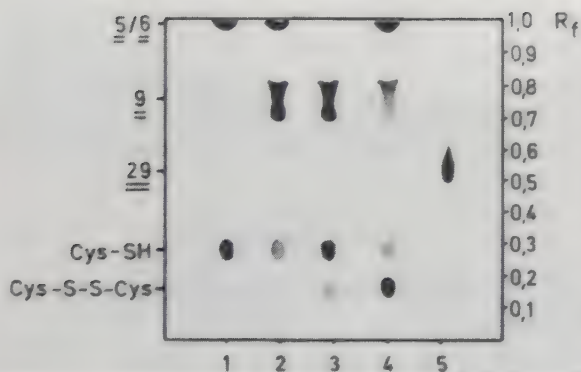


Abb. 13: DC der Cystein-Addition an 2-Äthyliden-3-methylsuccinimid (5/6) und der Oxidation des Thioäthers 9 mit 1% $\text{CrO}_3/2\text{n}$ H_2SO_4 .

Kieselgel G; Fließmittel VI c (s.Tab.6 ,S.107)

Nachweis: Cystein, Cystin, Thioäther 9 und Sulfon 29 mit Ninhydrin; 5/6, 9 und 29 mit Chlor/Benzidin

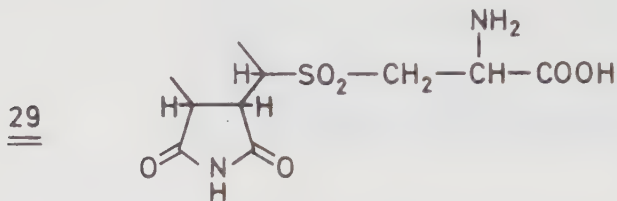
- 1) Vergleich 5/6, Cystein, Cystin
- 2) 5/6 + Cystein, äquimolar in 2n methan. NH_3 , RT, 1 h
- 3) 5/6 + Cystein im Überschuß in 2n methan. NH_3 , RT, 1 h
- 4) 5/6 + Cystein im Überschuß in 2n methan. NH_3 , RT, 4 h
- 5) 9 + Chromsäure, RT, 1 h

3.7.2. Behandlung des Thioäthers 9 mit Chromsäure

Die Behandlung von 9 mit Chromsäure wurde wieder sowohl bei RT als auch bei 100° vorgenommen.

Die Schwierigkeiten, die sich bei der Charakterisierung von 9 ergeben hatten, traten naturgemäß auch bei deren Oxidationsprodukt auf. So führte auch eine Extraktion mit polaren Lösungsmitteln wie Butanol nicht zur Anreicherung und Säuberung der Oxidationsprodukte. Die Charakterisierung mußte also auf dünnstschichtchromatographischem Weg direkt aus der Chromsäurelösung vorgenommen werden. Dabei ergab die Auftrennung in stark polaren Fließmitteln, daß sich anstelle von 9, welches verschwunden war, ein Oxidationsprodukt 29 gebildet hatte, das durch positive Nachweisreaktion sowohl mit Chlor/Benzidin als auch mit Ninhydrin identifizierbar ist.

Der kleinere R_f -Wert der als länglicher Fleck im DC auftretenden Verbindung 29 spricht für eine größere Polarität von 29 gegenüber 9 (s. Abb. 13). Da die Reaktion des Thioäthers 8 mit Chromsäure gut untersucht ist, darf angenommen werden, daß auch die Behandlung von 9 mit Chromsäure zum entsprechenden Sulfon führt, 29 also das Sulfon von 9 darstellt. Eine Auftrennung von 29 in zwei Isomere war nicht möglich.



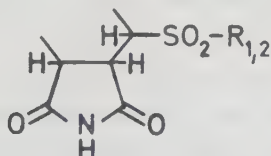
Die durch die Behandlung mit Chromsäure bewirkte Eliminierung von 9 zu 5/6 ist in bezug auf die Modellhaftigkeit für die Biliproteide sehr aufschlußreich. Dabei ist das Eliminierungsergebnis dem Charakter von Eliminierungsreaktionen entsprechend deutlich von der Temperatur abhängig. So führt die Behandlung von 9 mit Chromsäure bei RT zu einer Ausbeute an 5 von etwa 5%, während die Chromsäurebehandlung bei 100° bis zu 20% des Eliminierungsproduktes liefert (s. Abb. 14). Diese Werte wurden gaschromatographisch ermittelt und sind zusammen mit den Ergebnissen aus den Eliminierungen von 29 in Tabelle 5 festgehalten.

Das Eliminierungsergebnis der Chromsäurebehandlung von 9 bei 100° ist in der Größenordnung mit den Ergebnissen des hydrolytischen Chromsäureabbaus von Biliproteiden vergleichbar (92), so daß hierdurch der Modellcharakter von 9 für Ring I der Chromophore in Biliproteiden bekräftigt wird.

Von den beiden Stereoisomeren des Eliminierungsproduktes 5/6 tritt bei RT nur 5 auf, bei 100° 5/6 im Verhältnis von etwa 10:1. Die sterischen Aussagen über die Eliminierungsprodukte sind jedoch insofern eingeschränkt, als die Ausbeute bei RT sehr tief liegt und bei 100° sich ein thermisches Gleichgewicht aus 5 und 6 einstellt.

Außer dem Oxidationsprodukt 29 und den Eliminierungsprodukten 5 und 6 entstehen bei Chromsäurebehandlung von 9 regelmäßig zwei weitere Imide, die sehr ähnliche chromatographische Eigenschaften wie 20a und 20b besitzen (s. Abb. 14). Sie treten bei RT erst nach zehn Stunden, bei 100° schon nach einer Stunde deutlich in Er-

scheinung. Möglicherweise handelt es sich dabei um Imide mit intakter Sulfongruppe an C-2' und einem am Sulfon befindlichen Alkylrest, der durch Oxidation und anschließende Decarboxylierung der Aminosäurefunktion zustande gekommen ist (30, 31). Es kann sich hierbei um Isomere der gleichen Substanz (analog zu 20a und 20b) oder zwei verschiedene Verbindungen handeln.



30, 31

3.7.3. Behandlung des Thioäthers 9 mit Ammoniak und des Sulfons 29 mit Ammoniak und Chromsäure

Die Behandlung von 9 und 29 mit Ammoniak wurde bei RT und bei 100° vorgenommen. Außerdem wurde 29 mit Chromsäure bei 100° behandelt. Da weder 9 noch 29 rein isolierbar waren, mußte eine konstante Reaktionsfolge in Serie angewandt werden (s. Kap. 5.4.1.).

Die DC der Versuche ist in Abbildung 14 wiedergegeben, die gas-chromatographischen Ergebnisse enthält Tabelle 5, in die zum besseren Vergleich die in Kapitel 3.3. und 3.5.1. bereits zitierten Eliminierungswerte der Verbindungen 8 und 20 mit aufgenommen sind.

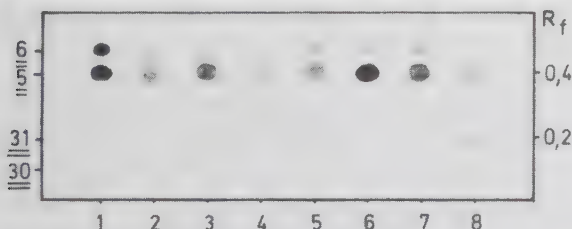


Abb. 14: DC der Reaktionen des Thioäthers 9 und des Sulfons 29 mit 2n wäbrigem Ammoniak und Chromsäure (1% CrO₃/2n H₂SO₄): Erfassung der Eliminierungsprodukte 5 und 6 und der Abbau-
produkte 30 und 31. Reaktionszeit jeweils 1 Stunde. DC-Bedingungen wie in Abb.2, S. 16.

- | | |
|------------------------------------|---------------------------------|
| 1) Vergleich <u>5</u> und <u>6</u> | 5) <u>9</u> + Chromsäure, 100° |
| 2) <u>9</u> + Ammoniak, RT | 6) <u>29</u> + Ammoniak, RT |
| 3) <u>9</u> + Ammoniak, 100° | 7) <u>29</u> + Ammoniak, 100° |
| 4) <u>9</u> + Chromsäure, RT | 8) <u>29</u> + Chromsäure, 100° |

Die schon bei der Eliminierung von 8 und 20 beobachtete Nivellierung der Ergebnisse im Fall der Behandlung mit heißem Ammoniak wird durch die Ergebnisse aus 9 und 29 bekräftigt. Da die Ausbeuten des Eliminierungsproduktes 5/6 bei Anwendung von heißem Ammoniak für 8, 9, 20 und 29 sehr ähnlich sind, scheint der Faktor, der die Größenordnung der Ausbeute maßgeblich bestimmt, weniger die Eliminierbarkeit der einzelnen Verbindungen als die Beständigkeit von 5/6 unter diesen Bedingungen zu sein.

Tabelle 5: Eliminierungen der Thioäther 8 und 9 und der Sulfone 20 und 29 mit 2n wäßrigem Ammoniak und mit Chromsäure (1% $\text{CrO}_3/2n \text{H}_2\text{SO}_4$) bei 20° und bei 100° , 1 h; Aliquote einer Lösung von 2-Äthyliden-3-methylsuccinimid (5/6) werden zu 8, 9, 20 und 29 umgesetzt und sofort für die Eliminierungsversuche verwendet.

Die in der GC bestimmten Ausbeuten an 5 und 6 sind in % angegeben.

Zur Eliminierung eingesetzt	<u>8</u>		<u>20</u>		<u>9</u>		<u>29</u>	
Elim.-produkte	<u>5</u>	<u>6</u>	<u>5</u>	<u>6</u>	<u>5</u>	<u>6</u>	<u>5</u>	<u>6</u>
NH_3 , RT	5-10	< 5	45-50	5-10	10-20	< 5	> 80	5-10
NH_3 , 100°	20-60	5-10	50-70	~ 5	30-60	< 5	50-70	~ 5
Chromsäure, RT	< 5	0	0	0	~ 5	0	< 5	0
Chromsäure, 100°	~ 5	0	0	0	10-20	< 5	5-10	< 5

Umso aussagekräftiger sind die Eliminierungsergebnisse bei RT. Aus der Tabelle 5 ist ersichtlich, daß der Thioäther 9 und sein Oxidationsprodukt 29 leichter eliminieren als der Thioäther 8 und dessen Sulfon 20. Offenbar ist der größere Alkylrest am Schwefel in Verbindung mit einem Nachbargruppeneffekt der Amino- oder Carboxylgruppe für die gesteigerte Labilität des Thioäthers 9 sowie des Sulfons 29 gegenüber 8 bzw. 20 verantwortlich.

Noch aufschlußreicher als der Vergleich der verschiedenen Alkylreste am Schwefel ist der Vergleich von Thioäther und Sulfon des Cystein-Adduktes. Während der Thioäther 9 gemäß dem in Schema 11 formulierten Gleichgewicht von vornherein zur Eliminierung neigt, was durch die Behandlung mit Ammoniak leicht beschleunigt wird,

ist die Eliminierung des Sulfons 29 durch Ammoniak bei RT nahezu quantitativ. Damit wird zum einen wiederum die Labilität des Sulfons gegenüber Basen bestätigt (s. Kap. 3.5.); zum anderen ist hier das erste Mal die fast vollständige Abspaltung eines Thioäthers an C-2' durch dessen Oxidation und nachfolgende Ammoniak-Behandlung gelungen. Diese Tatsache ist für die ganze Serie der Modellversuche von entscheidender Bedeutung.

Besonderes Gewicht erhält dieser Befund, wenn man ihn mit dem Eliminierungsergebnis der Chromsäurebehandlung von 9 unter hydrolytischen Bedingungen vergleicht: Maximal 20% Ausbeute an 5/6 aus 9 bei dessen hydrolytischer Thioätherspaltung stehen über 90% Ausbeute an 5/6 bei kombinierter Anwendung von Chromsäure und Ammoniak bei RT gegenüber. Damit ist angedeutet, daß auch dort, wo in den Biliproteiden eine Thioätherbindung vorliegt, bisher nicht die optimalen Abspaltungsmöglichkeiten ausgeschöpft wurden. Deshalb soll die Methode, der Chromsäure-Behandlung eine Ammoniak-Einwirkung folgen zu lassen, auch auf die Biliproteide übertragen und für diesen Zweck als Chromsäure/Ammoniak (CrO_3/NH_3)-Abbau bezeichnet werden (s. Kap. 4.).

Um sicherzustellen, daß die entscheidende Wirkung der Chromsäure-Mischung die Oxidation des Thioäthers und nicht die Säureeinwirkung ist, wurde die Reaktionsfolge auch mit reiner Schwefelsäure anstelle der Chromsäure durchgeführt. Die Behandlung des Thioäthers 9 mit Schwefelsäure bei RT ergibt keine Abweichung von den Resultaten der Chromsäurebehandlung von 9 bei RT, denn es zeigt sich nur eine spurenhafte Eliminierung. Die anschließende Behandlung mit Ammoniak bringt dann wieder nur eine Eliminierungsrate, die der bei Behandlung von 9 mit Ammoniak entspricht, sich aber entscheidend von der Eliminierungsrate des mit Chromsäure behandelten Thioäthers abhebt.

Die Behandlung von 29 mit Chromsäure bei 100° zeigt einen geringen, doch gut reproduzierbaren Unterschied zu der direkten Umsetzung von 9 mit heißer Chromsäure: Die Eliminierung verläuft in geringerem Ausmaß. Damit ist das entsprechende Ergebnis, das bei 20 erhalten wurde, bestätigt. Sulfone sind also unter hydrolytischen Bedingungen im Sauren stabiler als die analogen Thioäther.

Überraschend ist die Stereospezifität der Eliminierung von 29 bei Einwirkung von Ammoniak bei RT. Über 80% an 5 stehen 5-10% an 6 gegenüber. Dies ist wieder ein neuer Eliminierungstyp im Vergleich

zu den Eliminierungen von 7 und 20. Denn bei 7 verläuft die Eliminierung zwar quantitativ, aber das Eliminierungsprodukt ist uneinheitlich; bei 20 ist umgekehrt das Eliminierungsprodukt recht einheitlich (5), dafür verläuft die Eliminierung nur zu maximal 60%. Bei 29 wird schließlich fast quantitativ (über 90%) und sterisch so einheitlich wie bei 20 über die Summe möglicher Isomere eliminiert.

Nun ist zunächst wahrscheinlich, daß bei der Cysteinaddition wie bei der Addition von Äthanthiol an 5/6 nur trans-Verbindungen entstehen, da die für den Thioäther 8 gefundene sterische Hinderung der cis-Konfiguration erst recht für den Thioäther 9 gelten sollte. Das bedeutet, daß die Isomere vom Typ C und D nicht auftreten.

Darüber hinaus ist jetzt auch bei der beidseitigen Cysteinaddition (an C-2') sowohl an 5 als auch an 6 der sterische Effekt einer Behinderung durch die Methylgruppe an C-3 eher ausgeprägter als bei der Addition von Äthanthiol, wo er nur für die Addition an 6 festgestellt wurde. Dies hätte zur Folge, daß die Addition bevorzugt von der der Methylgruppe an C-3 gegenüberliegenden Seite der Ringebene erfolgt und aus 5 somit in erster Linie der Isomerentyp A, aus 6 der Isomerentyp B entsteht.

Das Verhältnis der zur Addition eingesetzten E- und Z-Form der Äthylidenbindung würde also in etwa das Verhältnis der Isomerentypen A und B von 9 und damit 29 bestimmen. Da Typ A quantitativ, Typ B offensichtlich nur zum Teil eliminiert (s. Tab. 3, S.48), müßte dann das eingesetzte 5 ganz, das eingesetzte 6 teilweise zurückerhalten werden (vgl. auch Schema 10, S.56).

Tatsächlich entspricht bei der quantitativen Bestimmung der Eliminierungsreaktion die Ausbeute des Eliminierungsproduktes 5 genau der zur Addition eingesetzten Menge an 5, und die bei der Eliminierung erhaltene Menge an 6 macht etwa die Hälfte der eingesetzten Menge an 6 aus (Abbildung 15).

So darf man wohl annehmen, daß bei der Synthese von 9 aus 5 überwiegend Typ A entsteht. Das Auftreten von Typ B bei Einsatz von 5 ist aufgrund der Versuche nicht ausgeschlossen; es sollte nach den Resultaten der Addition von Äthanthiol, wo Typ A und Typ B in gleicher Menge entstehen, auch zu erwarten sein.

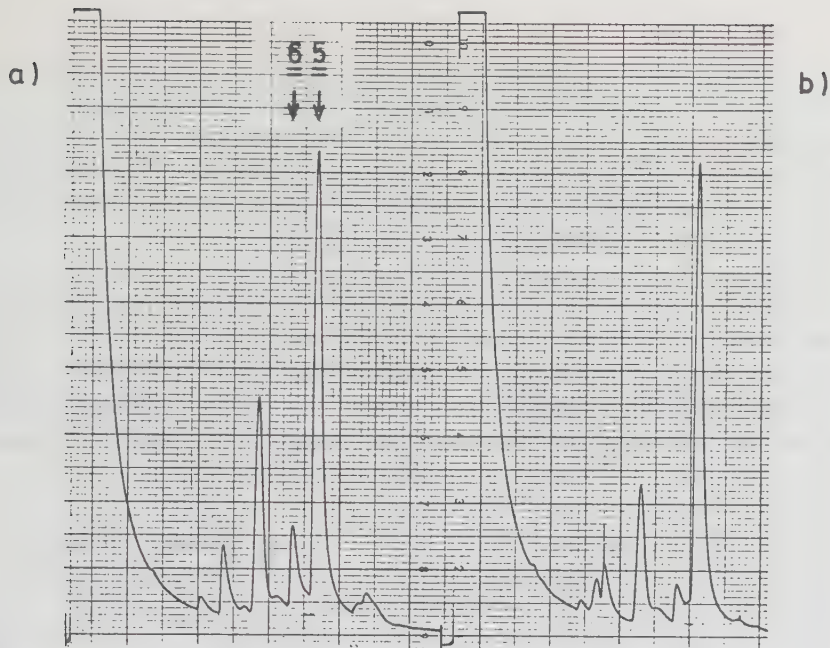


Abb. 15: Gaschromatogramm der Eliminierungsreaktion des Sulfons 29 mit 2n wäßrigem Ammoniak bei RT; Aliquote einer Lösung von 5/6 (gewonnen aus nicht gereinigtem Chlorimid 7) werden
a) direkt im GC bestimmt,
b) zu 9 und dann zu 29 umgesetzt; die bei Eliminierung von 29 freiwerdende Menge an 5/6 wird bestimmt.
GC-Bedingungen s. Kap. 5.1.2.; Schreibergeschwindigkeit: 60 inch/h; Retentionszeiten: 5: 3,5 min.; 6: 3,15 min.

3.7.4. Versuche mit Cystein-Derivaten

In Handversuchen wurde die Reaktionsfolge von Addition, Oxidation und Eliminierung auch mit Cysteinderivaten durchgeführt.

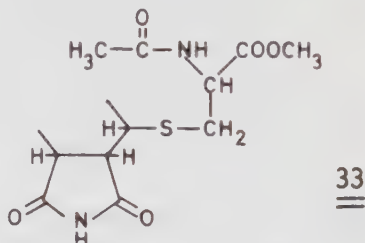
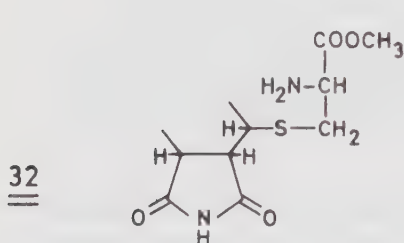
Eingesetzt wurden zu diesem Zweck der Cystein-methylester sowie N-Acetyl-Cystein-methylester, welche durch Umsetzen von Cystein und N-Acetylcystein in methanolischer Salzsäure erhältlich waren.

Die Addition von Cystein-methylester an 5/6 (Verhältnis 5/6 etwa 4:1) führt zu 32, die Addition von N-Acetyl-Cystein-methylester an 5/6 zu 33. Die Addukte 32 und 33 wurden in der DC durch Nachweisreaktionen mit Chlor/Benzidin und Ninhydrin identifiziert. Es gab hierbei keine chromatographische Aufspaltung in Doppelflecke, also

keine Hinweise auf das Vorliegen von Isomerenpaaren.

Bei diesen Additionen ist in noch stärkerem Maße als bei der Synthese von 2 der Verlust des zu addierenden Thiols durch Disulfidbildung zu beobachten. Das in Schema 11 zum Ausdruck gebrachte Gleichgewicht gilt daher auch für die Cysteinderivate.

Nach Behandlung mit Chromsäure und Einstellung der Lösung auf pH=10 mit Ammoniak wurden die Eliminierungsprodukte im Sauren extrahiert. Es entsteht wieder 5:6 im Verhältnis etwa 10:1, so daß sich aus dem Entstehen der E- und Z-Form des Eliminierungsproduktes keine Unterschiede zwischen den Addukten mit geschützter (32, 33) und freier Amino- und Carboxyl-Funktion (2) ableiten lassen.



3.8. Schlußfolgerungen aus den Modellversuchen

3.8.1. Reaktivität an C-2'

In allen Modellversuchen hat sich gezeigt, daß die 2'-X-äthyl-3-methylsuccinimide an C-2' ein Zentrum mit hoher Reaktivität aufweisen. Chlor-, R-S- und R-SO₂-Substituenten neigen schon in schwach basischem Medium zur Eliminierung. Besonders glatt verläuft die Eliminierung bei Cl- und R-SO₂-Resten, soweit keine sterische Hinderung für die Eliminierung vorliegt.

Ein Grund für die Leichtigkeit dieser Reaktion ist u.a. die Stabilität des dabei gebildeten Olefins. Die exocyclische Doppelbindung in 5/6 scheint eine Stabilisierung des nicht spannungsfreien Succinimid-Fünfrings zu bewirken. Hinweise darauf, daß 5 zumindest stabiler als das Isomere mit endocyclischer Doppelbindung - 2-Äthyl-3-methylmaleinimid - ist, sind in Kapitel 2.3. beschrieben.

Umgekehrt zur leichten Bildung des Olefins ist auch dieses wieder leicht zur Reaktion an C-2' befähigt. Aufgrund einer vinylogenen

Polarisierung der Doppelbindung zwischen C-2 und C-2' ist C-2' positiviert. Daher ist dort mit nukleophilen Reagentien in basischem Medium eine glatte Addition möglich. Erschwert wird diese Addition, wenn keine basische Katalyse erfolgt, unmöglich wird sie in saurem Medium. Deshalb ist auch keine Umkehr der Eliminierung von 7, also Addition von HCl an 5/6 zu bewerkstelligen. Dagegen ist die Thiolgruppe offenbar in besonderem Maße zur reversiblen Bindung an C-2' befähigt. Denn in basischem Medium gelingt sowohl die Addition wie auch die Eliminierung, so daß für Thiole und 5/6 unter diesen Bedingungen ein Gleichgewicht formuliert werden kann.

Diese Tatsache erscheint nun äußerst bedeutungsvoll, wenn man die Bindungsverhältnisse zwischen Ring I des Chromophors und dem Protein in Biliproteiden ins Auge faßt. Die dort gefundene Thioätherbindung ist zwar nicht exakt mit den Thioäthern der Modellimide vergleichbar, weil im Farbstoff die vinyloge Polarisation an C-2' für den Fall der Addition wegfällt. Doch zum einen ist die Addition die ohnehin glatter ablaufende Reaktion des Thiols, und zum anderen ist auch für die Eliminierung im Farbstoff eine Stabilisierung des entstehenden Olefins durch die Zugehörigkeit zu einem System konjugierter Doppelbindungen gewährleistet.

Daher muß vor allem für den Fall einer basischen Umgebung des Chromophors im Protein die Reversibilität der Thioätherbindung in Biliproteiden diskutiert werden. Dies hat insbesondere im Fall des Phytochroms weitreichende Konsequenzen für Wirkungsmodelle (s. Kap. 4.6.).

3.8.2. Sterische Aussagen (III)

Mit der Synthese der Succinimide 7, 8 bzw. 20 und 9 bzw. 29 stehen drei Modellklassen zur Verfügung, die bei gleicher chemischer Reaktivität an C-2' gegenüber Basen den Einfluß sterischer Effekte deutlich demonstrieren. Da sich die Eliminierungsergebnisse von 7, 20 und 29 prinzipiell unterscheiden, kann man folgende Staffelung nach der Größe der Substituenten an C-2 erkennen:

Den kleinsten Substituenten weist 7 auf. Unabhängig davon, ob in 7b nur Typ B oder nur Typ D oder beide Typen mit β -Konfiguration im Gemisch vorliegen, sind die Isomeren dieses Imids jeweils zur quantitativen Eliminierung befähigt, da die Größe des Substituenten keine sterische Hinderung provoziert.

Eine Mittelstellung nimmt 20 (8) ein: Bereits bei der Synthese, beim

Schritt der Thioladdition, wird offensichtlich aus sterischen Gründen die cis-Konfiguration ausgeschlossen. Von den beiden trans-Verbindungen ist die eine wegen erschwelter Einstellung der trans-Eliminierungs-Position an der Eliminierung gehindert. Erst aufgrund dieser sterischen Hinderung eines Isomeren verläuft die Eliminierung insgesamt sterisch einheitlicher als bei 7.

Bei 9 bzw. 29 schließlich hat die Größe des Substituenten nicht nur den Ausschluß der cis-Konfiguration bei der Synthese zur Folge, sondern bewirkt zusätzlich, daß im ersten Schritt der Synthese, der Thioladdition an C-2', bevorzugt von der der Methylgruppe gegenüberliegenden Seite addiert wird; das hat bei sterisch einheitlichem Ausgangsmaterial zur Folge, daß von vier möglichen Isomeren überwiegend eine Form gebildet wird.

So wird deutlich, wie die zunehmende Größe des Substituenten zu einer Auslese der Konfigurationen führt, wie zuerst die cis- und schließlich auch die β -Konfiguration aus sterischen Gründen unwahrscheinlich werden. Dies ist ein weiterer wesentlicher Gesichtspunkt für die Untersuchungen an Biliproteiden.

4. Übertragung der Modellversuche auf Biliproteide und ein Bilipeptid

4.1. C-Phycocyanin aus Pseudanabaena sp.

C-Phycocyanin ist das am häufigsten vorkommende Biliproteid mit blauem Chromophor. Es ist aus einer großen Reihe von Algen isoliert und charakterisiert worden. Der neueren Einteilung zufolge (s. Kap. 1.1.1.) ist es das einzige Biliproteid, in dem ausschließlich der bei 615-620 nm absorbierende blaue Chromophor auftritt. Deshalb eignet es sich besonders gut zur Untersuchung der Bindungsverhältnisse am blauen Chromophor. Pro Molekül werden drei Chromophore angenommen, zwei für die schwerere β -Kette und einer für die leichtere α -Kette (41, 106, 108).

Bei der Aufklärung der Bindungsverhältnisse zwischen Ring I des Chromophors und dem Protein in C-Phycocyanin sind in jüngerer Zeit Biliproteide aus verschiedenen Algen eingesetzt worden. CRESPI und SMITH (23) setzten *Phormidium luridum*, BEUHLER et al. (6) *Plectonema boryanum* und *Phormidium luridum*, KÖST (53) *Anacystis nidulans* ein. Im allgemeinen werden bevorzugt solche Algen herangezogen, die über-

wiegend C-Phycocyanin synthetisieren. WAGENMANN und RÜDIGER (108) gelang die Aufzucht einer neuen Algenart, *Pseudanabaena* sp., die sowohl C-Phycocerythrin als auch C-Phycocyanin in großen Mengen produziert. Dadurch ist für Strukturaussagen an Biliproteiden die Möglichkeit gegeben, die roten und blauen Farbstoffe aus ein und demselben Organismus direkt zu vergleichen.

Die Strukturuntersuchungen an C-Phycocyaninen haben - wie in Kapitel 1.2.3. beschrieben - zu unterschiedlichen Aussagen über die Bindungsverhältnisse an Ring I des Chromophors geführt. Das Modell der Thioätherbindung an C-2¹ basiert u.a. auf der Anwendung des hydrolytischen Chromsäureabbaus (85).

Nun tut sich allerdings gerade, wenn man diese Methode einer Strukturaussage bei C-Phycocyanin zugrundelegt, ein Widerspruch zu den analogen Strukturaussagen bei C-Phycocerythrin (s. Kap. 4.2.1.) auf, denn die Anwendung der gleichen Methode hatte bei den beiden verschiedenen Biliproteiden zu deutlichen quantitativen Unterschieden in den Ergebnissen geführt (53): Die Ausbeute des Abbauproduktes $\underline{5/6}$ aus Ring I stand bei C-Phycocyanin in ganz anderem Verhältnis zur Menge des eingesetzten Proteins als bei C-Phycocerythrin. Während aus C-Phycocerythrin etwa 10% der Theorie von $\underline{5/6}$ erhalten wurden, lieferte C-Phycocyanin nur etwa 1% (H.-P. KÖST, persönliche Mitteilung). Diese Unterschiede in den Ausbeuten von Ring I konnte man auf dreierlei Arten erklären:

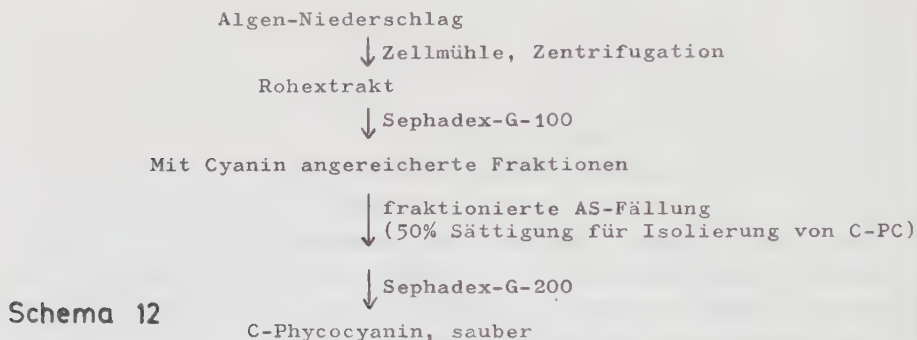
1. Da inzwischen durch parallele Chromophor-Untersuchungen an C-Phycocyanin und Phytochrom die Ähnlichkeit dieser beiden Chromophore erhärtet worden war (45), war die Möglichkeit gegeben, daß C-Phycocyanin eine andere Proteinbindung des Chromophors an Ring I aufwies als C-Phycocerythrin, etwa ähnlich der bei Phytochrom, wo bei wiederholten Abbauprobeversuchen mit Chromsäure Ring I nicht erhältlich war (s. Kap. 4.3.).
2. Für jedes einzelne Protein mit definierter Absorption mußten nicht in jedem Organismus die gleichen Bindungsverhältnisse ausgebildet sein.
3. Bei den entsprechenden Versuchen stand verschieden sauberes Material zur Verfügung.

4.1.1. Isolierung und Charakterisierung von C-Phycocyanin

Die Isolierung von C-Phycocyanin erfolgt nach dem in Schema 12 angegebenen Anreicherungs- und Reinigungsverfahren (s. Kap. 5.5.2.).

Der Rohextrakt enthält C-Phycoerythrin in etwa 3-4facher Menge wie C-Phycocyanin.

Der entscheidende Reinigungsschritt ist die Auftrennung an Sephadex-G-200, wo der bei G-100 nicht abgetrennte Rest von eingipfligem C-Phycoerythrin gut von C-Phycocyanin entfernt werden kann.



Schema 12

Das als Lyophilisat isolierte C-Phycocyanin läßt sich spektral und elektrophoretisch charakterisieren: Eine analytische Gelelektrophorese mit anschließender Protein-Markierung durch Coomassie-Blau (46) zeigte außer C-Phycocyanin keine weiteren Proteinbestandteile des Lyophilisats.

Das UV-Spektrum ist in Abbildung 16 dargestellt. Der Quotient $E_{618} : E_{280}$ hat den Wert 5,5 (vgl. Lit. 40: 6,1 - bei C-Phycocyanin aus *Synechococcus* sp.).

Der hohe Reinheitsgrad des isolierten Materials ermöglicht die Bestimmung der molaren Extinktion aus genauen Mengen-Extinktions-Beziehungen. Eine Einwaage von 1 mg pro 1 ml 0,1 m Phosphatpuffer vom pH=7 muß 1:15 verdünnt werden, um im empfindlichen Bereich des Photometers $E = 0-0,5$ meßbar zu sein. Die verdünnte Lösung ergibt eine Extinktion von 0,41. Damit ergibt sich $E_{1\text{mg}/1\text{ml}}$ zu 6,2. Aus diesem Wert folgt für ein Molekulargewicht von 41 000 (108) eine molare Extinktion von $\epsilon = 235\,000 \text{ [1/Mol.cm]}$.

Der so gewonnene ϵ -Wert spricht für das Vorliegen von drei Chromophoren pro monomerem Molekül C-Phycocyanin, wenn man ihn mit anderen Daten von Biliproteiden vergleicht (42).

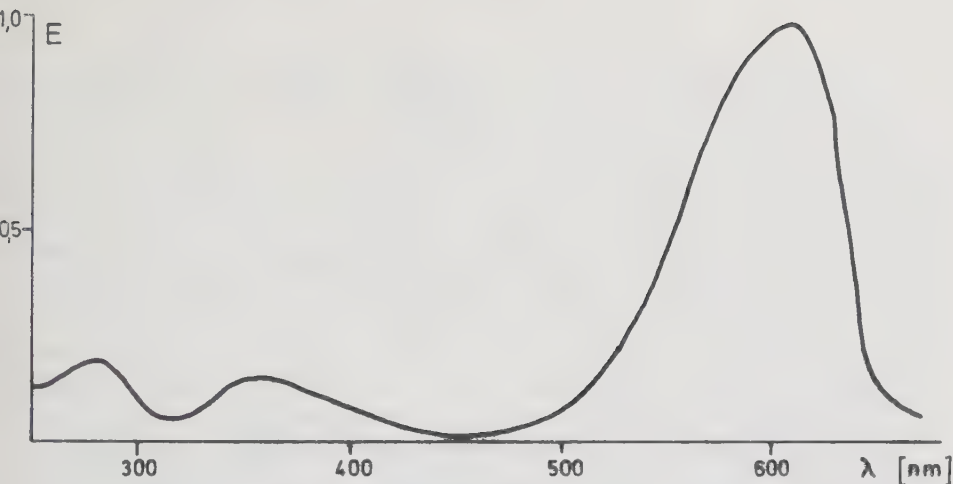


Abb. 16: Qualitatives Elektronenspektrum des nach Schema 12 isolierten C-Phycocyanins aus *Pseudanabaena* sp.;
0,1 m Phosphatpuffer pH = 7.

4.1.2. Chromsäureabbau und kombinierter CrO_3/NH_3 -Abbau

Der von RÜDIGER (82,83) für die Biline und die Biliproteide eingeführte Chromsäure- und Chromatabbau führt zu vier Imiden aus den vier Ringen des Chromophors. Am Beispiel des Gallenfarbstoffs Phycobiliverdin (3), den man als Chromophor aus Phycocyanin abspalten kann (22,35,70), ist das Prinzip des Chromsäureabbaus der Biline in Schema 13a dargestellt.

In den Biliproteiden sind zwei Ringe des Chromophors mit dem Protein verknüpft. Dort führt die Anwendung des Chromsäureabbaus bei RT zur Freisetzung zweier Imide; die beiden noch gebundenen Imide werden jeweils durch saure Hydrolyse in Freiheit gesetzt. Dies ist am Beispiel des C-Phycocyanins in Schema 13b verdeutlicht. Die Frage, ob Ring II oder III mit dem Protein verbunden ist, läßt sich durch Kombination von Chromsäure- und Chromatabbau beantworten (84).

Die Versuche zum Abbau von C-Phycocyanin mit CrO_3/NH_3 (s. S.63) wurden parallel mit den bisher üblichen hydrolytischen Chromsäureabbauten durchgeführt. Um die an den Modellverbindungen entwickelte neue Abbaumethode mit der hydrolytischen Methode vergleichen zu können und die Ausbeuten der Abbauprodukte festzulegen, müssen die Versuchsergebnisse quantifizierbar sein. Als Grundlage der quantitativen Aussagen wurde die DC der Abbauprodukte herangezogen. Dafür gibt es folgende Argumente:

Da der Abbau der Phycobiliproteide im Halbmikromaßstab erfolgt - wofür schon die Farbstoffmenge verantwortlich ist - ist eine Erfassung der Gesamtmenge der Abbauprodukte für quantitative Aussagen wünschenswert. Bei der DC kann der ganze Extrakt einer vorher definiert eingewogenen Farbstoffmenge auf die Platte aufgetragen werden, während bei der GC die Herstellung so kleiner Volumina, daß der gesamte Extrakt in einer Einspritzung auf die Säule kommt, mit erheblichen Fehlern und experimentellen Schwierigkeiten verbunden ist.

Das Problem der quantitativen Auswertung auf der Platte kann auf folgende Weise gelöst werden: Von einer definierten Stammlösung der synthetisch hergestellten Verbindung 5 werden in kontinuierlicher Reihe verschiedene Mengen als Eichgrößen auf dieselbe Platte aufgetragen, auf der in der vorausberechneten gleichen Größenordnung die Abbauprodukte des Biliproteides ausgewertet werden. Durch Sichtvergleich läßt sich dann die Ausbeute mit genügender Genauigkeit bestimmen. Zur genaueren Absicherung der unterschiedlichen Mengen bei verschiedenen Abbaumethoden kann man zusätzlich folgende Kontrolle vornehmen: Von einem definierten Gesamtvolumen jedes Extraktes werden einige definierte Teilvolumina auf die Platte aufgetragen und so jeweils die verschiedenen Extrakte miteinander verglichen.

Das Verfahren des CrO_3/NH_3 -Abbaus muß bei der Übertragung von den Modellimidin auf die Biliproteide in einigen Punkten modifiziert werden. Bei der Behandlung des Biliproteides mit Chromsäure bei RT wird das Protein denaturiert und fällt als in Säure schwerlöslicher Niederschlag aus. Da Ring I hierbei mit dem Protein verbunden bleibt (84), wird der Proteinniederschlag abzentrifugiert, mehrmals gewaschen und dann in 2n wäßrigem Ammoniak aufgenommen. Es entsteht eine gelartige, schleimige Lösung. Sie wird nach einer Stunde, in der mehrmals gerührt wird, mit Schwefelsäure wieder auf einen pH von 0-1 gebracht. Dabei muß die ammoniakalische Lösung gut in Eis vorgekühlt sein, damit sie durch die Neutralisationswärme nicht über die RT hinaus erwärmt wird. Beim Ansäuern fällt wieder das Protein aus, das man erneut abzentrifugiert. Der Überstand wird extrahiert. Drei Ansätze werden miteinander verglichen:

1. 3,6 mg C-Phycocyanin werden 1 Stunde direkt dem hydrolytischen Chromsäureabbau unterworfen (1% $\text{CrO}_3/2\text{n H}_2\text{SO}_4$, diese Konzentration wird stets beibehalten).
2. 3,6 mg C-Phycocyanin werden 1 Stunde mit Chromsäure bei RT be-

handelt (a), der Proteinniederschlag wird 1 Stunde mit Chromsäure bei 100° behandelt (b).

3. 3,6 mg C-Phycocyanin werden 1 Stunde mit Chromsäure bei RT behandelt (a), der Proteinniederschlag wird 1 Stunde mit 2n Ammoniak bei RT behandelt (b).

Bei der Bemessung der Volumina wird darauf geachtet, daß die zur Extraktion gelangenden Abbau Lösungen stets gleiche Volumina aufweisen. Extraktionsmittel ist in allen Fällen Äthylacetat. Das Chromatogramm des Abbaues ist in Abbildung 17 wiedergegeben.

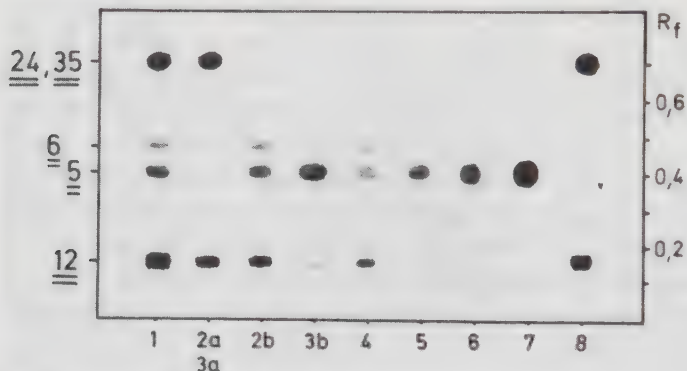


Abb. 17: DC des Chromsäure- und CrO_3/NH_3 -Abbaus von C-Phycocyanin (Konzentrationen der Lösungen und Mengen der äquivalenten Ansätze 1, 2 und 3 s. Text); Kieselgel GF_{254} ; Fließmittel (s. Tab.6, S.107) Id (bis $R_f=1$), danach IIa (bis $R_f=0,3$); Nachweis: Chlor/Benzidin

- 1) Biliproteid + Chromsäure, 100°
- 2a)=3a) Biliproteid + Chromsäure, RT
- 2b) Proteinniederschlag + Chromsäure, 100°
- 3b) Proteinniederschlag + Ammoniak, RT
- 4) 1/4 der Menge von 2b)
- 5) 1/4 der Menge von 3b)
- 6) Vergleich: 6 μg 5
- 7) Vergleich: 12 μg 5
- 8) Vergleich: Bilirubin (1) + Chromsäure, RT (s.Kap.5.6.4.)

Ergebnisse: Die Chromsäurebehandlung bei 100° führt zu den Abbauprodukten 2-Äthyliden-3-methylsuccinimid (5/6) aus Ring I, Hämatinsäureimid (12) aus Ring II und III sowie 2-Äthyl-3-methylmalein-

imid (24) aus Ring IV, was mit früheren Ergebnissen übereinstimmt (53,92). Dabei ist es offensichtlich gleich, ob der Farbstoff direkt (Ansatz 1) oder der Proteinniederschlag (Ansatz 2) mit heißer Chromsäure behandelt wird.

Der Chromsäureabbau in der Kälte setzt Ring II und IV in Freiheit, Ring I und III bleiben gebunden; diese werden durch Hydrolyse abgespalten.

Die Behandlung des Proteinniederschlages mit Ammoniak bei RT führt zur Freisetzung von Ring I, dagegen nur in Spuren von Ring III.

Sehr deutlich ist der Unterschied zwischen CrO_3/NH_3 - und hydrolytischem Chromsäureabbau. Der erste Unterschied betrifft Ring III, der bei Hydrolyse freigesetzt wird, bei Ammoniak-Behandlung weitgehend gebunden bleibt. Der zweite Unterschied betrifft die Ausbeute von Ring I. Diese kann folgendermaßen bestimmt werden: Das Molekulargewicht beträgt 41 000 (108). Bei drei Chromophoren treten als Abbauprodukte drei Imide 5/6 mit einem Molekulargewicht von zusammen 417 auf. Werden 3,6 mg Cyanin eingesetzt, so erhält man die theoretische Ausbeute an 5/6, wenn man 3 600 μg mit dem Quotienten $417:41\ 000 = 0,010$ multipliziert. 36 μg 5/6 entsprechen 100% Ausbeute. Als Eichmengen sind 6 μg und 12 μg synthetisches 5 aufgetragen, die auf der Platte zu beobachtende Ausbeute an 5/6 aus C-Phycocyanin nach CrO_3/NH_3 -Abbau liegt ziemlich genau zwischen diesen beiden Eichgrößen, die Ausbeute an 5/6 nach hydrolytischem Chromsäureabbau liegt sichtlich unter 6 μg .

Durch gegenseitigen Vergleich der verschiedenen Auftragsmengen bei wiederholten Versuchen kann man aussagen, daß die mit CrO_3/NH_3 freigesetzte Menge von 5/6 etwa dreimal so groß ist wie die mit Chromsäure bei 100° freigesetzte. Damit beträgt die Ausbeute an 5/6 beim hydrolytischen Chromsäureabbau 7-10, beim CrO_3/NH_3 -Abbau 20-30% der Theorie.

Die Isomerenverhältnisse betreffen den dritten Unterschied zwischen beiden Methoden. Beim hydrolytischen Chromsäureabbau entsteht ein Gemisch von 5:6 im Verhältnis etwa 5:1, während beim CrO_3/NH_3 -Abbau praktisch nur 5 entsteht und 6 an der Grenze der Nachweisbarkeit liegt (<1% der Theorie).

4.1.3. Interpretation der Ergebnisse; Strukturaussagen für C-Phycocyanin

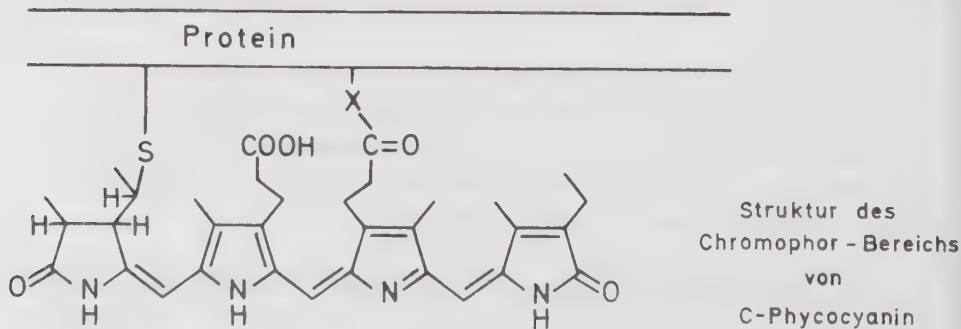
Der hydrolytische Chromsäureabbau führt zu den bekannten Resultaten

(53,92). Die Ausbeuten an $\underline{5/6}$ liegen jedoch deutlich höher als beim vergleichbaren Versuch von KÖST (53), der ausdrücklich darauf verweist, daß er aus C-Phycocyanin eine erheblich geringere Ausbeute an $\underline{5/6}$ erhielt als aus B-Phycoerythrin. Die oben angegebene Ausbeute von 7-10% für C-Phycocyanin entspricht in der Größenordnung aber wiederum der schon von RÜDIGER und O'CARRA (92) für R-Phycoerythrin erhaltenen und auch von KÖST für B-Phycoerythrin bestätigten Ausbeute an $\underline{5/6}$. Von daher erscheint im Gegensatz zu den Ergebnissen von KÖST die Bindung zwischen Protein und Ring I des Chromophors im untersuchten C-Phycocyanin der bei Phycoerythrin nachgewiesenen Verknüpfung (s. Kap. 4.2.) vergleichbar.

Die signifikante Abweichung des Ergebnisses aus dem CrO_3/NH_3 -Abbau von dem Resultat des hydrolytischen Chromsäureabbaus erlaubt nun allerdings gezieltere Aussagen:

Die Ausbeutesteigerung von $\underline{5/6}$ bei Anwendung von CrO_3/NH_3 entspricht genau den Ergebnissen der analogen Reaktionen bei den Modellimiden: Sowohl der Thioäther $\underline{8}$ als auch der Thioäther $\underline{9}$ eliminieren bei Behandlung mit Chromsäure bei 100° nur zum geringen Teil zu $\underline{5/6}$. Dagegen eliminieren die beiden Sulfone $\underline{20}$ und $\underline{29}$ bei Behandlung mit Ammoniak bei RT zu mehr als 50%.

Daraus kann man den direkten Schluß ziehen, daß im nativen Bili-proteid ein Thioäther vorliegt, der einerseits mit Chromsäure bei 100° nur mäßig spaltbar ist, andererseits mit Chromsäure schon bei RT zum Sulfon oxidiert wird, so daß die nachfolgende Behandlung mit Ammoniak zu besserer Eliminierung und damit zu höherer Ausbeute des Abbauproduktes $\underline{5/6}$ führt. Die Analogie der spezifischen Reaktionen fordert so zur Annahme einer Analogie der Strukturen heraus. Somit gilt die Struktur $\underline{34}$ für C-Phycocyanin.



Alle anderen Verknüpfungsmöglichkeiten an Ring I des Chromophors, die bereits diskutiert worden sind (s. Kap. 1.2.3.), stehen, wenn man weitere Daten heranzieht, mit diesem Versuchsergebnis nicht in Einklang.

Auch das sterische Verhalten der Eliminierungsprodukte stützt die Analogie zu bestimmten Modellimidin. Das fast ausschließliche Auftreten von 5 (neben minimalen Spuren von 6), das schon bei den Modellimidin von Stereotyp A festgestellt worden war, kann auch beim C-Phycocyanin wieder beobachtet werden. Damit ist gleichzeitig das Eliminierungsprodukt 6, das unter hydrolytischen Bedingungen verstärkt auftritt, als sekundär durch thermische Isomerisierung im Säuren entstandenes und somit sterisch nicht aussagekräftiges Abbauprodukt des Biliproteides charakterisiert (vgl. Lit. 54).

Die beim CrO_3/NH_3 -Abbau gefundenen 20-30% Ausbeute an Ring I sind zwar eine deutliche Verbesserung gegenüber der hydrolytischen Methode, entsprechen jedoch nicht den hohen Ausbeuten bei der Eliminierung der Modellsulfone mit Ammoniak. Dafür ist unter Umständen das Protein verantwortlich, wo mögliche nukleophile Gruppen unter ammoniakalischen Bedingungen mit 5/6 reagieren können, so daß ein Teil dieses Abbauproduktes wieder abgefangen wird.

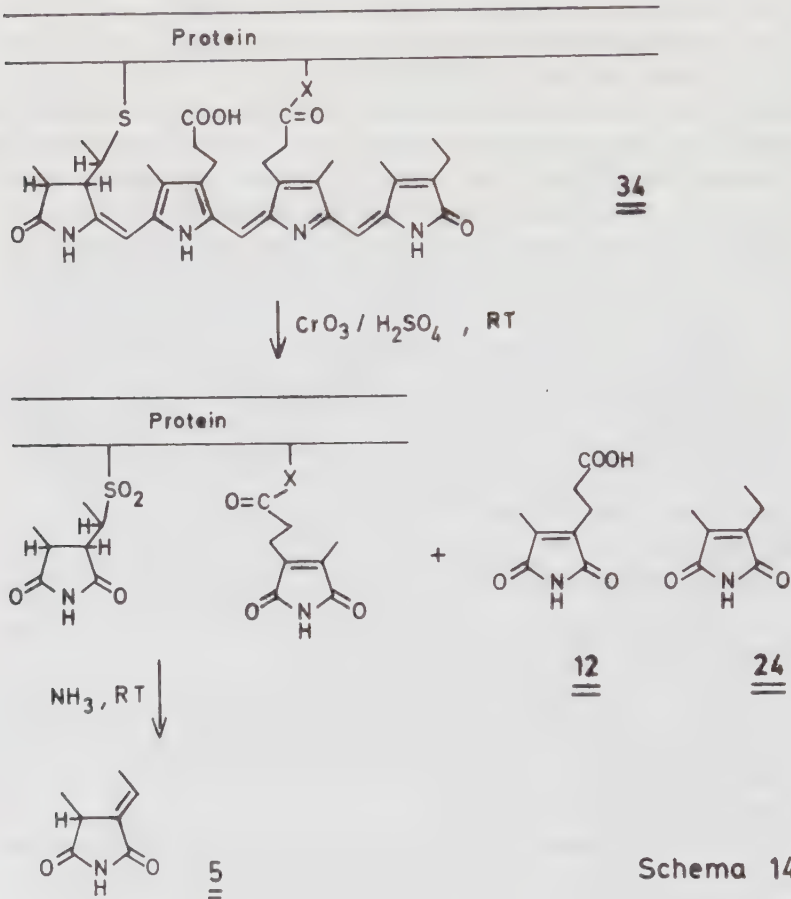
Eine derartige Reaktivität im Basischen weisen die beiden anderen Abbauprodukte 12 und 24 nicht auf. Deshalb erscheint deren Ausbeute als nahezu quantitativ, was nebenbei auch über den Sichtvergleich mit synthetischem 5 bekräftigt wird:

Nimmt man für 5/6 die gleiche Intensität der Anfärbung mit Chlor/Benzidin wie für 12 und 24 an, so entspricht die Menge von 12 aus Ring II oder III sowie von 24 aus Ring IV derjenigen Menge von synthetischen 5 recht gut, die das Vierfache der aus Ring I erhaltenen Menge darstellt (35 μg).

Es fällt auf, daß 2n Ammoniak Ring III nicht bzw. nur spurenweise in Freiheit setzt. Dadurch wird eine Esterbindung zwischen der Carboxylgruppe an Ring III und einer OH-Gruppe aus dem Protein weniger wahrscheinlich, da diese unter solchen Bedingungen zumindest partiell verseift werden sollte. Andererseits spricht der Befund nicht gegen die ebenfalls diskutierte Amidbindung an dieser Stelle. Es kann sich hier zweifellos nur um Hinweise handeln, denn zur beweiskräftigen Aufklärung dieser Bindungsverhältnisse bedarf es spezifischerer Untersuchungsmethoden (vgl. Kap. 4.3.3.).

Die Ergebnisse des CrO_3/NH_3 -Abbaus von C-Phycocyanin erlauben die Erstellung eines Abbauschemas, das die in Schema 13 gezeigten Ab-

bauwege ergänzt und dabei insbesondere die Spezifität der Freisetzung von Ring I aus dem Biliprotein erhöht. Den CrO_3/NH_3 -Abbau zeigt Schema 14.



4.2. C-Phycoerythrin aus *Pseudanabaena* sp.

C-Phycoerythrin ist der Hauptfarbstoff der Alge *Pseudanabaena* sp.. Das Biliprotein enthält nur den roten Chromophor mit einem Maximum bei 557 nm. GLAZER und HIXSON (42) postulieren für C-Phycoerythrin aus *Aphanocapsa* sp. sechs Chromophore pro Molekül, geben allerdings keine Aufteilung auf die Untereinheiten an. BENNETT und BOGORAD (4) nehmen für C-Phycoerythrin aus *Fremyella diplosiphon*

drei Chromophore pro Molekül analog zu C-Phycocyanin an, zwei in der schweren β -Kette, einen in der α -Kette. Beim vorliegenden C-Phycoerythrin aus *Pseudanabaena* sp. hat MUCKLE über die Bestimmung der molaren Extinktion eines gut gereinigten Chromopeptids fünf Chromophore für das Gesamtprotein berechnet (68). Ungeachtet dessen ist wie bei C-Phycocyanin anzunehmen, daß die Proteinbindung an Ring I des Chromophors bei allen Chromophoren je Molekül einheitlich ausgebildet ist.

Die Art der Verknüpfung an Ring I in Erythrinen wurde wie bei den Cyaninen lange Zeit auf verschiedene Weise gedeutet. RÜDIGER und O'CARRA (92) hatten schon für C-Phycoerythrin sowie für R-Phycoerythrin beim hydrolytischen Chromsäureabbau analoge Ergebnisse wie beim C-Phycocyanin erhalten. Diese wurden später im Sinne einer Thioätherbindung gedeutet; andere Daten, insbesondere aus einer genaueren Untersuchung von *Cryptomonas*-Phycoerythrin (15,16), sprachen bei Erythrinen eher für die Äther- als für die Thioätherbindung. Andere Strukturvorschläge (23,24,84) (s. Kap. 1.2.3.) wurden bald von den zunehmenden Daten überholt (85).

KÖST (53,55) sowie KÖST-REYES et al. (56) haben für B-Phycoerythrin die Thioätherbindung sehr wahrscheinlich gemacht (s. Kap. 1.2.3.). Seitdem besitzt dieser Strukturvorschlag eine Art Pilot-Funktion in der Diskussion um die Proteinbindung aller Biliproteide.

4.2.1. Isolierung und Charakterisierung von C-Phycoerythrin

Da C-Phycoerythrin in *Pseudanabaena* sp. gegenüber C-Phycocyanin im Überschuß vorhanden ist und ein etwas höheres Molekulargewicht besitzt (108), gestaltet sich die Isolierung dieses Biliproteides leichter als beim Phycocyanin.

Bereits ein Arbeitsschritt reicht aus, C-Phycoerythrin ohne Verunreinigungen mit anderen Biliproteiden aus dem Rohextrakt abzutrennen. Dies ist entweder über eine DEAE-Cellulose-Säule oder eine Gelfiltration an Sephadex-G-100 möglich. Eine schnellere Abtrennung in kleinerem Maßstab leistet die DEAE-Cellulose, die nach dem Ionenaustauscherprinzip arbeitet.

Eine Abtrennung in größerem Maßstab ermöglicht die Gelfiltration mittels Sephadex-G-100. Sie ist bei Gewinnung von hochreinem Material als erster Schritt vorzuziehen. In beiden Fällen ist das abgetrennte C-Phycoerythrin mit farblosen Fremdproteinen verunreinigt. Für den Abbau des Biliproteides wird das in einem Arbeits-

schritt abgetrennte Material mit AS-Fällung konzentriert, dialysiert und gefriergetrocknet. Das Spektrum eines so gewonnenen Lyophilisats ist in Abbildung 18 wiedergegeben.

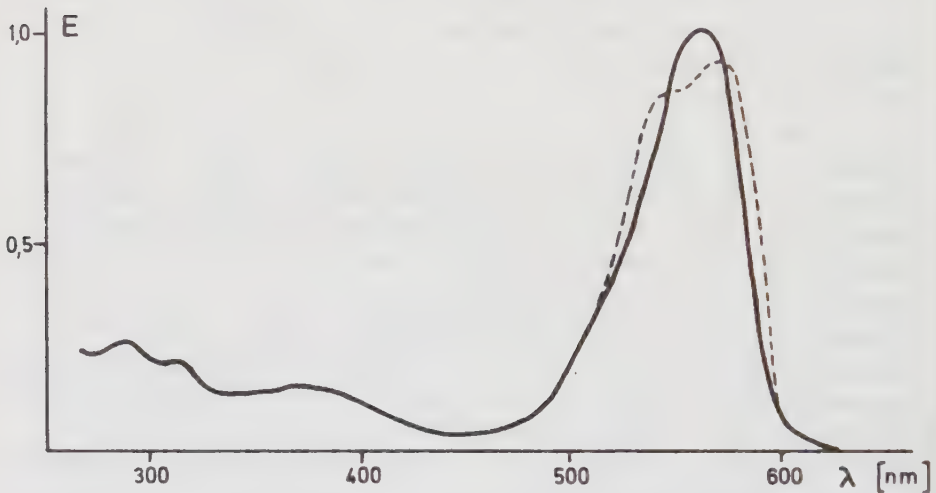


Abb. 18: Qualitatives Elektronenspektrum des über DEAE-Cellulose gereinigten C-Phycoerythrins aus *Pseudanabaena* sp.; 0,1 m Phosphatpuffer pH = 7.

———— natives eingipfliges C-Phycoerythrin
----- proteolysiertes zweigipfliges C-Phycoerythrin

Es zeigt im sichtbaren Bereich eine saubere Absorption des roten Chromophors mit nur einem Maximum, worauf sich die Zugehörigkeit zur Gruppe der C-Phycoerythrine gründet.

Interessanterweise verändert sich das Spektrum von C-Phycoerythrin, wenn der Rohextrakt nicht sofort aufgearbeitet wird. Die dabei stattfindende Proteolyse führt gleichzeitig mit einer Verkürzung der Proteinkette zu einer signifikanten Änderung der Absorption (68). Das eine scharfe Maximum spaltet in zwei Maxima mit verbreiteter Absorption auf. Das Spektrum eines solchen "gealterten" C-Phycoerythrins, das dem eines B-Phycoerythrins ähnlicher als dem eines nativen C-Phycoerythrins ist, findet sich in Abbildung 18 mit eingezeichnet.

Auch dieser Typ des C-Phycoerythrins wird einem CrO_3/NH_3 -Abbau

unterworfen.

Weitere Daten des gut untersuchten (68,108) eingipfligen C-Phycocerythrins sind: Das Molekulargewicht beträgt 42 500; die Extinktion von einem mg pro ml beträgt 9,4; daraus resultiert eine molare Extinktion ϵ von 404 000. Als Reinheitskriterium dient das Verhältnis der Extinktion bei 557 nm zu der bei 280 nm. Bei hochgereinigtem Material beträgt der Wert des Quotienten 6,8 (108); das für den Abbau eingesetzte Phycoerythrin weist lediglich den Wert 4 auf.

4.2.2. Chromsäureabbau und kombinierter CrO_3/NH_3 -Abbau

Das in Schema 13 für C-Phycocyanin angegebene Prinzip des Abbaus läßt sich unter Abwandlung der Verhältnisse an Ring IV vollgültig auf C-Phycocerythrin übertragen.

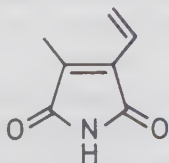
Der hydrolytische Chromsäureabbau sowie der kombinierte CrO_3/NH_3 -Abbau werden in der gleichen Weise durchgeführt wie bei C-Phycocyanin beschrieben (s. Kap. 4.1.2.). Sowohl die Reihenfolge der Arbeitsschritte als auch die Art der quantitativen Erfassung der Abbauprodukte entsprechen sich.

Es werden vier Ansätze untersucht:

1. 3,8 mg eingipfliges C-Phycocerythrin werden 1 Stunde direkt mit Chromsäure bei 100° behandelt.
2. 3,8 mg eingipfliges C-Phycocerythrin werden 1 Stunde mit Chromsäure bei RT behandelt (a), der Proteinniederschlag wird 1 Stunde mit Chromsäure bei 100° behandelt (b).
3. 3,8 mg eingipfliges C-Phycocerythrin werden 1 Stunde mit Chromsäure bei RT behandelt (a), der Proteinniederschlag wird 1 Stunde mit verd. Ammoniak bei RT behandelt (b).
4. 2,5 mg zweigipfliges C-Phycocerythrin werden wie unter 3) dem CrO_3/NH_3 -Abbau unterworfen (a und b).

Das Chromatogramm des Abbaubetriebes zeigt Abbildung 19.

Ergebnis: Die Ergebnisse sind mit denen von C-Phycocyanin vergleichbar: Bei kaltem Chromsäureabbau werden Hämatinsäureimid (12) und 2-Vinyl-3-methylmaleinimid (35) in Freiheit gesetzt.



35

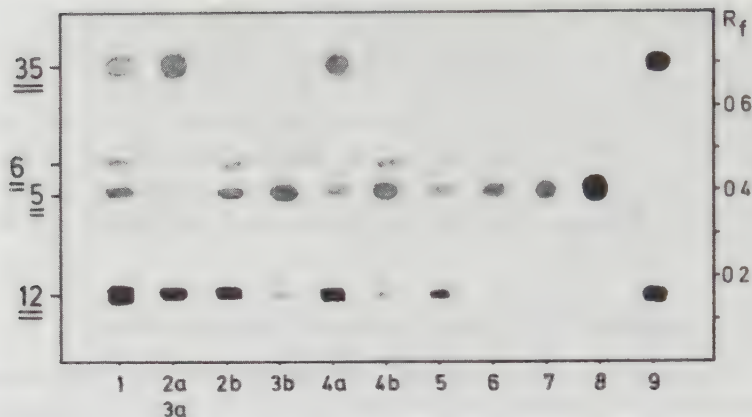


Abb. 19: DC des Chromsäure- und CrO_3/NH_3 -Abbaus von ein- und zweigipfligem C-Phycoerythrin (1% $\text{CrO}_3/2\text{n H}_2\text{SO}_4$; 2n Ammoniak). Ansätze wie im Text; DC-Bedingungen wie bei Abb.17, S.74

- 1) natives Biliproteid + Chromsäure, 100°
- 2a)=3a) natives Biliproteid + Chromsäure, RT
- 2b) Proteinniederschlag + Chromsäure, 100°
- 3b) Proteinniederschlag + Ammoniak, RT
- 4a) zweigipfliges Biliproteid + Chromsäure, RT
- 4b) Proteinniederschlag + Ammoniak, RT
- 5)=Ansatz 2b), $1/4$ der Menge von 2b)
- 6)=Ansatz 3b), $1/4$ der Menge von 3b)
- 7) Vergleich: 6 μg 5
- 8) Vergleich: 12 μg 5
- 9) Vergleich: Bilirubin (1) + Chromsäure, RT (s. Kap.5.6.4.

Diese Abbauprodukte können nach Chromsäure- und Chromatabbauten von RÜDIGER (84) an Phycoerythrin den Ringen II und IV zugeordnet werden. Die geringe Ausbeute an 35 beruht auf der Instabilität dieses Imids in der Chromsäure und entspricht früheren Versuchsergebnissen (83,85).

Die Hydrolyse des Proteinniederschlages führt dann zur Abspaltung der Ringe I und III, die als 5/6 bzw. 12 in Erscheinung treten. Die Ergebnisse aus den Ansätzen (1) und (2) weisen keinen sichtbaren Unterschied auf.

Die Ammoniakbehandlung des Proteinniederschlages setzt wieder nur Ring I in Freiheit, fast ausschließlich als 5 mit Spuren von 6. Ring III erscheint bei Ammoniakbehandlung ebenso wie im Falle des

Phycocyanins in Spuren ($\sim 1-3\%$) als 12.

Setzt man fünf Chromophore für das Biliproteid voraus, so liegen die Ausbeuten des Abbauproduktes 5/6 bei beiden Methoden der Proteinabspaltung etwas niedriger als beim C-Phycocyanin. Dafür dürfte in erster Linie der geringere Reinheitsgrad des eingesetzten Materials verantwortlich sein. Beim hydrolytischen Abbau liegt die Menge des erhaltenen Imids 5/6 zwischen 5 und 10% der Theorie, und das Verhältnis der Isomeren 5:6 beträgt etwa 5:1; bei der Eliminierung mit Ammoniak liegt die Ausbeute zwischen 15 und 25% der Theorie und 6 tritt bis zur Nachweisgrenze in den Hintergrund ($< 1\%$ d.Th.).

Eine Besonderheit zeigt der CrO_3/NH_3 -Abbau des zweigipfligen C-Phycoerythrins. Zum einen führt die Behandlung mit Chromsäure bei RT nicht nur zu 12 und 35 aus den Ringen II und IV, sondern zusätzlich zu 5 in etwa 3-8% Ausbeute (je nach Alterungsgrad). Zum anderen liefert die Eliminierung mit Ammoniak das Abbauprodukt aus Ring I in anderen Isomerenverhältnissen als dies beim eingipfligen C-Phycoerythrin der Fall ist: Neben 5 ist 6 zu etwa 2-4% nachweisbar; das Verhältnis 5:6 beträgt etwa 5:1.

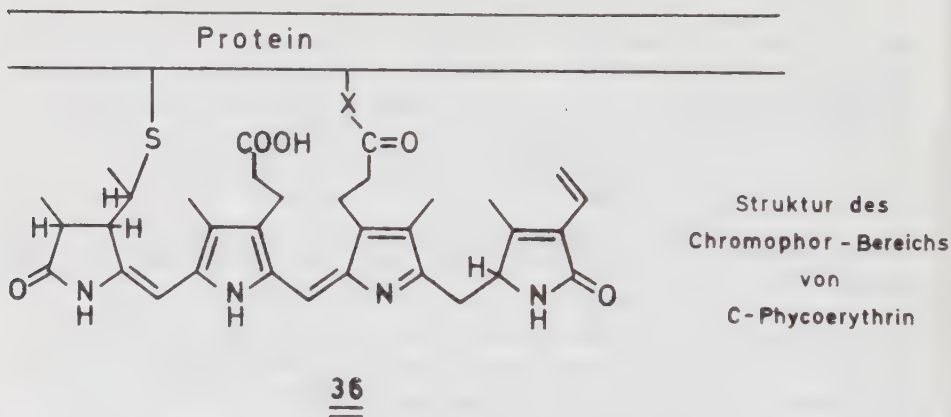
4.2.3. Interpretation der Ergebnisse; Strukturaussagen für C-Phycoerythrin

Die Ergebnisse des hydrolytischen Chromsäureabbaus von C-Phycoerythrin entsprechen denen, die schon für R-Phycoerythrin (92), B-Phycoerythrin (53,55) und C-Phycoerythrin (92) aus anderen Organismen erhalten wurden. Die Ausbeuten an 5/6 aus Ring I des Chromophors liegen in der gleichen Größenordnung wie bei den zitierten früheren Resultaten. Da die Erythrine gerade in bezug auf die Proteinbindungen des Chromophors die am besten untersuchten Biliproteide sind, kann in jedem Fall die aus diesen Versuchen abgeleitete Aussage auf das hier untersuchte C-Phycoerythrin übertragen werden: Die Proteinbindung an Ring I erfolgt an C-2¹ und bei ihrer Abspaltung entsteht die Äthyliden-Doppelbindung von 5/6.

Da überdies für B-Phycoerythrin Cystein als bindende Aminosäure an dieser Stelle nachgewiesen worden ist (56), liegt bereits aufgrund der Ergebnisse des hydrolytischen Chromsäureabbaus die Aussage nahe, daß auch für C-Phycoerythrin aus Pseudanabaena sp. die Thioätherbindung Gültigkeit hat.

Nun verhalten sich die Resultate aus dem CrO_3/NH_3 -Abbau und aus dem hydrolytischen Chromsäureabbau bei C-Phycoerythrin genauso zuein-

ander wie bei C-Phycocyanin. Sowohl die sterischen Verhältnisse als auch die Proportionen der Ausbeuten bei allen Abbauprodukten weisen auf die strukturelle Identität von C-Phycoerythrin und C-Phycocyanin bezüglich der Proteinbindung an Ring I des Chromophors. Das bedeutet, daß genau wie im Fall des Cyanins durch die Übertragbarkeit der Modellreaktionen auf das Biliproteid C-Phycoerythrin die Struktur an Ring I als Thioäther eindeutig manifestiert ist (36). Der blaue und der rote Chromophor sind in dem gleichen Organismus auf die gleiche Weise an Ring I mit dem jeweiligen Protein verknüpft. Schema 14 gilt somit für beide Biliproteide. Auf die Ergebnisse für das zweigipflige C-Phycoerythrin wird in Kapitel 4.5. ("Sterische Aussagen") näher eingegangen.



4.3. Chromopeptid von C-Phycoerythrin aus Pseudanabaena sp.

Als Ergänzung zu den Ergebnissen des Abbaus von C-Phycoerythrin wird ein isoliertes Chromopeptid von C-Phycoerythrin sowohl mit hydrolytischem Chromsäureabbau als auch mit CrO_3/NH_3 -Abbau untersucht. Damit kann einerseits kontrolliert werden, ob im Detail für einen Chromophor die gleichen Ergebnisse wie für die Summe der vermutlich fünf Chromophore gefunden werden. Andererseits läßt sich u.U. die Proteinbindung an Ring III näher charakterisieren.

Das Chromopeptid *) ist ein Pentapeptid, das durch Trypsinabbau von C-Phycoerythrin gewonnen wurde. Bei diesem Peptid wurde Glycin als

*) Das Peptid wurde freundlicherweise von Herrn G. MUCKLE zur Verfügung gestellt. Die in diesem Kapitel aufgeführten Daten sind seiner Arbeit entnommen.

N-terminal und Arginin als C-terminal charakterisiert. Dazwischen sind Cystein und Serin plaziert, die beide für eine Bindung an den Chromophor in Frage kommen. Als fünfte Aminosäure wurde Prolin gefunden. Durch EDMAN-Abbau wurde folgende Sequenz sichergestellt: Gly-Cys-Ser-Pro-Arg (68).

4.3.1. Chromsäureabbau und kombinierter CrO_3/NH_3 -Abbau

Der CrO_3/NH_3 -Abbau wird gegenüber dem Abbau der Biliproteide variiert, da nach Behandlung des Peptids mit Chromsäure bei RT kein Niederschlag entsteht. Die Arbeitsschritte entsprechen deshalb dem beim Modellimid 2 angewandten Verfahren (s. Ansatz 2).

Die Versuche wurden nicht quantitativ erfaßt, da nicht genügend Material zur Verfügung stand. So können keine exakten Ausbeute-Angaben gemacht werden.

Es werden zwei Ansätze untersucht:

1. Etwa $\frac{1}{2}$ μMol wird 1 Stunde mit Chromsäure bei 100° behandelt.
2. Die gleiche Menge wird 1 Stunde mit Chromsäure bei RT behandelt, danach viermal extrahiert (a) und dann mit konzentriertem Ammoniak auf $\text{pH} = 10-11$ eingestellt; nach 1 Stunde wird wieder angesäuert und extrahiert (b).

Das Chromatogramm des Abbaubersuchs zeigt Abbildung 20.

Ergebnis: Der hydrolytische Chromsäureabbau entspricht dem des Biliproteides; er führt wieder zu den drei Abbauprodukten $\underline{5/6}$, $\underline{12}$ und $\underline{35}$, in den bekannten Mengenverhältnissen. Beim Nachweis von $\underline{35}$, das im nahen UV eine typische violette Fluoreszenz zeigt, fällt auf, daß der R_f -Wert dieses Imids tiefer liegt als der der Vergleichssubstanz aus Bilirubin. Durch Zusatzversuche konnte geklärt werden, daß die Chromsäurebehandlung der Aminosäuren Cystein und Arginin, die im Peptid enthalten sind, zu einer im UV gut sichtbaren Verbindung führt, die unmittelbar oberhalb von $\underline{35}$ auf dem Chromatogramm läuft. Sie bewirkt eine R_f -Depression für $\underline{35}$).

Der CrO_3/NH_3 -Abbau zeigt gegenüber dem Biliproteid zwei Abweichungen. Die erste Abweichung tritt beim kalten Chromsäureabbau auf und ist nur geringfügig: Zusätzlich zu $\underline{12}$ und $\underline{35}$ tritt $\underline{5}$ in Spuren auf (vgl. Abbau von zweigipfligem C-Phycoerythrin, S.83).

*) Dieser Effekt konnte nur auf den DC-Fertigplatten mit extrem dichter Beschichtung festgestellt werden.

Die zweite Abweichung betrifft die Behandlung mit Ammoniak: Außer 5 wird 12 in etwas größerer Ausbeute in Freiheit gesetzt. Dabei wurde sichergestellt, daß 12 erst durch Ammoniakeinwirkung wieder entstanden war und nicht auf eine mangelhafte Extraktion der Lösung des kalten Chromsäureabbaus zurückgeführt werden konnte.

Eindrucksvoll ist die sterische Einheitlichkeit bei der ammoniakalischen Eliminierung von Ring I. Neben einer guten Ausbeute von 5 ist nicht die Spur von 6 nachzuweisen. Im Chromophorgehalt vergleichbare CrO_3/NH_3 -Abbauten von C-Phycocyanin und C-Phycoerythrin weisen stets Spuren von 6 auf, wenn auch in minimaler Menge.

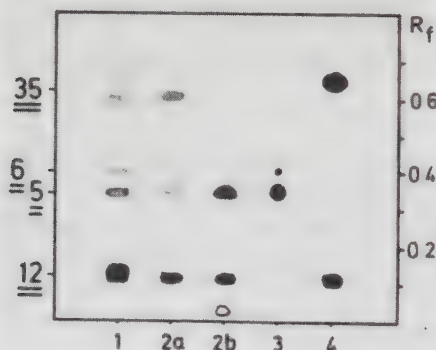


Abb. 20: DC des Chromsäure- und CrO_3/NH_3 -Abbaus des Chromopeptids aus C-Phycoerythrin (1% $\text{CrO}_3/2\text{n H}_2\text{SO}_4$; 2n Ammoniak); Ansätze wie im Text; Kieselgel 60 F254 (HPTLC); übrige Bedingungen wie Abb. 17, S. 74

- 1) Peptid + Chromsäure, 100°
- 2a) Peptid + Chromsäure, RT
- 2b) Lösung 2a) nach Extraktion auf pH=10 eingestellt
- 3) Vergleich: 5/6
- 4) Vergleich: Bilirubin (1) + Chromsäure, RT (s.Kap.5.6.4.)

4.3.2. Interpretation der Ergebnisse; Strukturaussagen für das Chromopeptid

Sowohl die Befunde aus dem hydrolytischen Chromsäureabbau als auch die aus dem CrO_3/NH_3 -Abbau bestätigen für den Teilbereich des C-Phycoerythrins, den das Chromopeptid darstellt, die Struktur der Thioätherbindung an Ring I des Chromophors.

Die Ausbeute an 5 bei Ammoniakbehandlung des vorher oxidierten

Peptids erscheint größer als bei vergleichbaren Versuchen mit den Biliproteiden. Sie kommt in der Größenordnung der Ausbeute von 12 beim Chromsäureabbau unter nicht-hydrolytischen Bedingungen nahe. Das steht mit der Überlegung, daß die Ausbeute an 5 bei den Biliproteiden aufgrund möglicher Artefakte beim Abbau gegenüber den Modellversuchen eingeschränkt ist, im Einklang (vgl. Kap. 4.1.3., S.75).

Das spurenhafte Auftreten von 5 bei kalter Chromsäurebehandlung spricht dafür, daß die Bindung partiell bereits gespalten ist, so daß ein geringer Bruchteil des Chromophors im Peptid bereits mit Äthylidenbindung vorliegt. Diese Erscheinung entspricht den Verhältnissen im zweigipfligen C-Phycoerythrin, tritt allerdings in deutlich geringerem Ausmaß auf (vgl. Abb.19 und Kap. 4.5.). Sie unterstreicht die Spaltbarkeit des nativen Thioäthers. Während dieser z.B. gegen Chromsäure bei RT stabil ist, bewirken sowohl Enzyme des Rohextraktes aus *Pseudanabaena* sp. (beim zweigipfligen Erythrin) als auch ein tryptischer Abbau des eingipfligen Biliproteides mit nachfolgender chromatographischer Auftrennung (beim Chromopeptid) seine Spaltung zu einem geringen Bruchteil. Die gegenüber der Behandlung mit Chromsäure bei RT sichtlich gesteigerte Ausbeute an 12 beim hydrolytischen Chromsäureabbau läßt darauf schließen, daß auch Ring III im Chromopeptid an eine der fünf Aminosäuren gebunden ist.

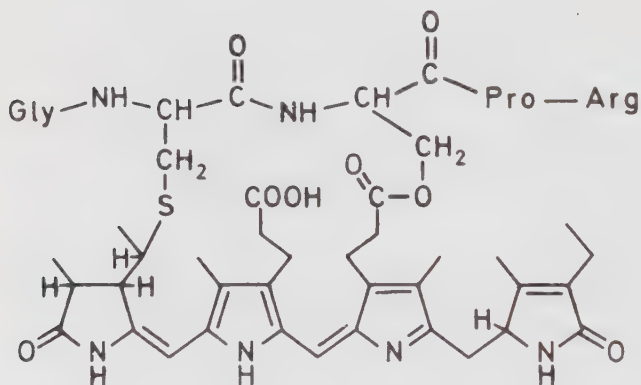
Die gleiche Aussage ergibt sich durch die Tatsache, daß 12 bei Ammoniakbehandlung in einer ähnlichen Größenordnung wie beim vorangegangenen Chromsäureabbau bei RT freigesetzt wird. Dieses bei keinem anderen CrO_3/NH_3 -Abbau von Biliproteiden beobachtete Resultat gestattet darüber hinaus einen Schluß auf die Art der Bindung: Eine Esterbindung zwischen Ring III und Serin sollte sich am ehesten so verhalten. Da auch die Ergebnisse des EDMAN-Abbaus für das Pentapeptid eine Chromophorverknüpfung sowohl am Cystein als auch am benachbarten Serin möglich erscheinen lassen (68), ist die Struktur 37 für das untersuchte Chromopeptid wahrscheinlich.

Für die Strukturverhältnisse im C-Phycoerythrin ergeben sich nun folgende zwei alternative Möglichkeiten:

1. Ring III ist im Biliproteid in der Regel über eine Esterbindung an das Protein gebunden. Die Ammoniakbehandlung ermöglicht jedoch keine Freisetzung aus dem Proteinniederschlag, weil dort die Bedingungen für eine Verseifung sehr ungünstig sind. Erst die "Freilegung" der Esterbindung im Peptid macht diese einer

Verseifung zugänglich.

2. Es sind zwar alle Chromophore an Ring III mit dem Protein verknüpft, aber die Art der Bindung kann verschieden sein. Es ist vorstellbar, daß an Ring III von den fünf angenommenen Chromophoren vier über eine Amidbindung verknüpft sind und nur einer über eine Esterbindung mit einer freien OH-Gruppe des Proteins verbunden ist. Während die Amidbindungen durch Ammoniak nicht angegriffen werden, ist die Esterbindung unter diesen Bedingungen zumindest teilweise spaltbar (vgl. Kap. 4.1.3.). Die als Spuren nachgewiesenen Mengen an 12 bei Ammoniakbehandlung des oxidierten Biliproteides könnten so der Ausbeute aus einem von fünf Chromophoren entsprechen. Das vorliegende Chromopeptid müßte dann die Ausnahme (mit Esterbindung) von der Regel (der Amidbindung) darstellen.



37

Strukturvorschlag
für das
Pentapeptid aus
C-Phytoerythrin

4.4. Phytochrom aus *Avena sativa*

Beim Phytochrom ist in jüngerer Zeit durch Denaturierungsversuche für die P_R -Form die gleiche Länge des Systems konjugierter Doppelbindungen wie beim Phycocyanobilin nachgewiesen worden (45). Genauere Strukturaussagen gehen auf den Chromat- und den Chromsäureabbau unter hydrolytischen Bedingungen zurück (88).

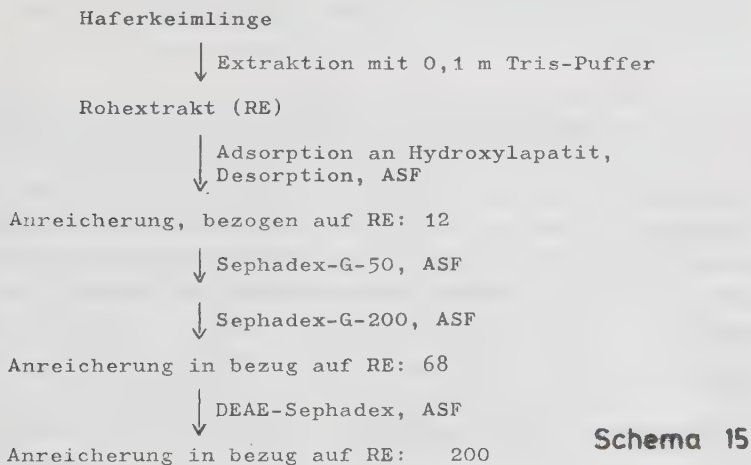
Kombiniert man die Ergebnisse dieser beiden Arbeiten, so kann für den Chromophor von P_R eine Struktur angegeben werden, die bis auf die Vinylgruppe an Ring IV der des Phycocyanobilins entspricht. Das bedeutet, daß Ring I an C-1 und C-2 hydriert vorliegt und entgegen ursprünglicher Annahmen (85) keine exocyclische Doppelbindung

aufweist.

Die Proteinbindung wird aufgrund der Chromsäureabbauten an Ring I und III angenommen (85). Das zunächst aus Ring I erhaltene Abbau-produkt 5 (88) wurde bei späteren Versuchen an saubererem Material nicht mehr gefunden (91), so daß die Bindung an Ring I weitgehend unklar blieb. Da die inzwischen vielfältig reproduzierbare Methode des Chromsäureabbaus für Phytochrom ein von den Befunden bei Algen-farbstoffen abweichendes Ergebnis gebracht hatte (91), nahm man auch eine andere Proteinbindung an Ring I als bei Phycoerythrinen und Phycocyaninen an (85).

4.4.1. Isolierung und Charakterisierung von Phytochrom *)

Die Isolierung von Phytochrom wurde auf der Stufe des Sephadex-G-50-Eluats aufgenommen **). Bis dahin war der aus Haferkeimlingen ge-wonnene Rohextrakt durch Adsorption an Hydroxylapatit und anschlies-sende Gelfiltration an Sephadex-G-50 vorgereinigt worden (44). Das Prinzip der Isolierung (44) ist in Schema 15 dargestellt.



Der Reinheitsindex des isolierten Lyophilisats, der als das Ver-hältnis $E_{280}:E_{660}$ definiert ist, beträgt durchschnittlich 20 (vgl.

*) Die in diesem Kapitel beschriebenen Arbeiten wurden in Zusammen-arbeit mit Herrn Dr. S. GROMBEIN durchgeführt.

**) Das vorgereinigte Material wurde freundlicherweise von Herrn Dr. S. GROMBEIN zur Verfügung gestellt.

0,8 für niedermolekulares Phytochrom aus Hafer, Lit. 78). Das Absorptionsspektrum im Sichtbaren zeigt Abbildung 21. Anhand dieser Abbildung kann auch das Verfahren zur Konzentrationsbestimmung erläutert werden. Diese Methode beruht auf der unterschiedlichen Absorption der beiden photoreversiblen Formen und der Proportionalität der Extinktionsdifferenzen beider Formen bei 660 nm und 730 nm. Sie war bekannt, bevor die Natur des Chromophors aufgeklärt wurde, und geht auf BUTLER et al. (17,18) zurück: Man mißt die Extinktionsdifferenzen $\Delta E = E_{660} - E_{730}$ beider P-Formen (in der Praxis jeweils nach Belichtung mit Dunkelrotlicht (730 nm) und Hellrotlicht (660 nm)) und bildet die Differenz der beiden ΔE -Werte:

$$\Delta E_{730} = E_{660} - E_{730} = \begin{array}{l} \text{Extinktionsdifferenz von} \\ P_R \text{ bei 660 und 730 nm} \\ (\text{gemessen nach Belichtung bei 730 nm}) \end{array}$$

$$\Delta E_{660} = E_{660} - E_{730} = \begin{array}{l} \text{Extinktionsdifferenz von } P_{FR} \text{ bei} \\ 660 \text{ und } 730 \text{ nm (gemessen nach Be-} \\ \text{lichtung bei 660 nm)} \end{array}$$

$$\Delta(\Delta E) = \Delta E_{730} - \Delta E_{660} = \text{Phytochromkonzentration}$$

Das so ermittelte $\Delta(\Delta E)$ ist der Phytochrom-Konzentration proportional. Die Multiplikation von $\Delta(\Delta E)$ mit dem Volumen der Lösung ergibt somit die Gesamtmenge an Phytochrom, die in "Phytochrom-Einheiten" angegeben wird. Die Menge einer P-Einheit kann man ermitteln, wenn man die molare Extinktion ϵ für ein Molekulargewicht von etwa 72 000 (44) in die LAMBERT-BEER'sche Gleichung einsetzt. Diese molare Extinktion haben TOBIN und BRIGGS (103) bestimmt:

$$\epsilon(P_{R,665}) = 70\,000 \text{ l/mol.cm}$$

$$E = \epsilon \cdot c \cdot d = 70\,000 \cdot \frac{1}{72\,000} \cdot 1 \quad c \approx \frac{1 \text{ mg}}{1 \text{ ml}} \text{ für } E = 1$$

Eine P-Einheit entspricht also etwa 1 mg an niedermolekularem Phytochrom. So läßt sich auch die Menge an Phytochrom im Lyophilisat angeben: Es enthält zu 4,5% Phytochrom, das bedeutet 95,5% Fremdprotein.

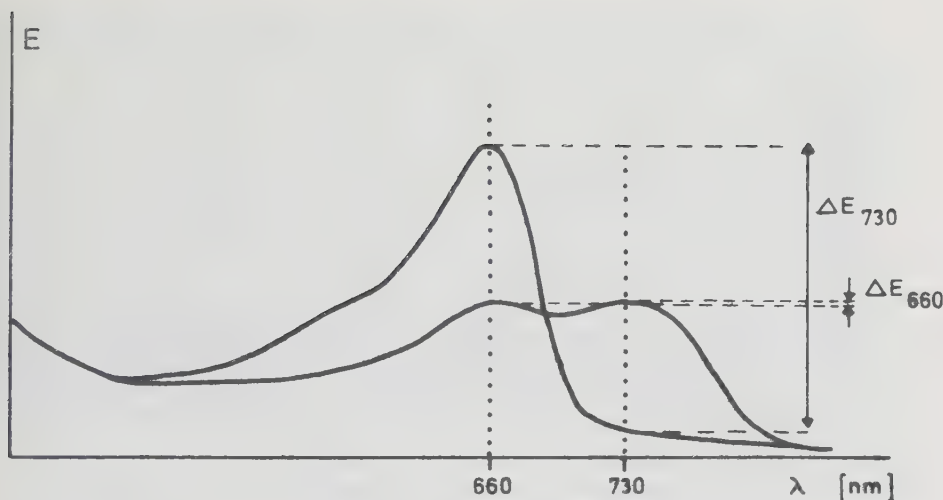


Abb. 21: Qualitatives Elektronenspektrum der beiden photoreversiblen Formen von Phytochrom, gemessen an einem für den Abbau eingesetzten Lyophilisat, das in 0,01 m Tris-Puffer pH = 7,8 aufgenommen wurde.

4.4.2. Chromsäureabbau und kombinierter CrO_3/NH_3 -Abbau

a) Abbau eines Gemisches von P_R und P_{FR}

Gefriergetrocknetes Material, leicht grünlich, das überwiegend in der P_R -Form vorliegen dürfte, wird sowohl dem hydrolytischen Chromsäureabbau als auch dem CrO_3/NH_3 -Abbau unterworfen. Zusätzlich wird hier ein modifizierter CrO_3/NH_3 -Abbau angewandt, indem der durch Chromsäure entstandene Proteinniederschlag mit Ammoniak bei 100° statt bei RT behandelt wird. Es soll dadurch geprüft werden, ob der hohe Anteil an Fremdprotein bei RT die Freisetzung von Imidinen verhindert.

Es werden drei Ansätze untersucht:

1. 1,3 P-Einheiten werden 1 Stunde mit Chromsäure bei RT behandelt (a); der Proteinniederschlag wird 1 Stunde mit Chromsäure bei 100° behandelt (b).
2. Wie unter (1a); der Proteinniederschlag wird 1 Stunde mit Ammoniak bei RT behandelt (b).
3. Wie unter (1a); der Proteinniederschlag wird 1 Stunde mit Ammoniak bei 100° behandelt (b).

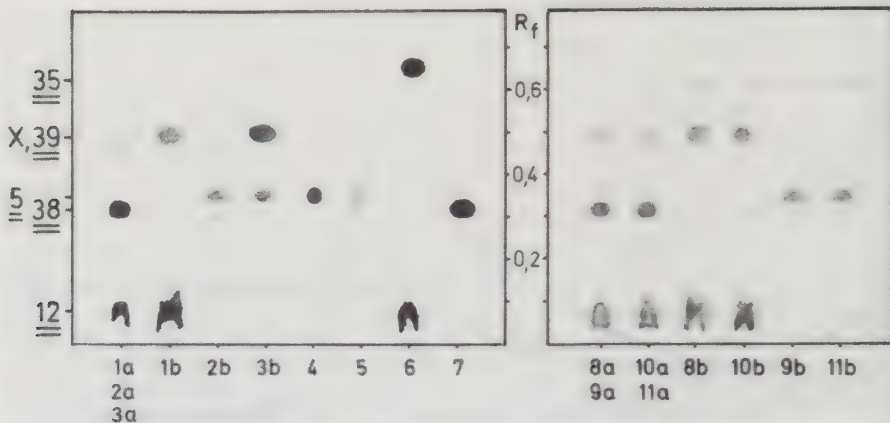


Abb. 22: DC des Chromsäure- und CrO_3/NH_3 -Abbaus von Phytochrom (1% $\text{CrO}_3/2\text{n H}_2\text{SO}_4$; 2n Ammoniak); Ansätze von (a) wie im Text; Kieselgel 60 F 254 (HPTLC); Fließmittel Id (s.Tab.6,S.107); Nachweis: Chlor/Benzidin

a) Abbau eines Gemisches von P_R und P_{FR}

b) Abbau von P_R und P_{FR} getrennt

a)

1a)=2a)=3a) Phytochrom + Chromsäure, RT

1b) Proteinniederschlag + Chromsäure, 100°

2b) Proteinniederschlag + Ammoniak, RT

3b) Proteinniederschlag + Ammoniak, 100°

4) Vergleich: 2 μg 5

5) Vergleich: 0,2 μg 5

6) Vergleich: Bilirubin (1) + Chromsäure, RT (s.Kap.5.6.4.)

7) Vergleich: Isatin (38)

b)

8a)=9a) P_R + Chromsäure, RT

10a)=11a) P_{FR} + Chromsäure, RT

8b) P_R -Proteinniederschlag + Chromsäure, 100°

10b) P_{FR} -Proteinniederschlag + Chromsäure, 100°

9b) P_R -Proteinniederschlag + Ammoniak, RT

11b) P_{FR} -Proteinniederschlag + Ammoniak, RT

Die sechs Extrakte werden nach Einengen über Stickstoff alle quantitativ auf die DC-Platte aufgetragen. Als quantitativer Vergleich wird 5 in definierten Mengen, als qualitativer Vergleich werden 12 und 35 als Abbauprodukte von Bilirubin mit aufgetragen.

b) Abbau getrennt nach P_R und P_{FR}

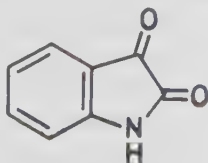
Die Arbeiten werden bis zum Schluß unter Grünlicht durchgeführt, um jegliche Lichteinwirkung auszuschalten.

Da für diesen Versuch nur 3,6 P-Einheiten isoliert wurden, konnten nur je zwei Ansätze für beide Formen untersucht werden. Dabei kommt es jeweils zum Vergleich von hydrolytischem Chromsäureabbau und CrO_3/NH_3 -Abbau.

Es werden vier Äquivalente der Gesamtlösung entnommen. Je zwei Proben werden nach Hellrotbestrahlung (660 nm) und je zwei nach Dunkelrotbelichtung (730 nm) mit Chromsäure 1 Stunde bei RT behandelt. Die Proteinniederschläge werden je einmal mit Chromsäure 1 Stunde bei 100° und mit Ammoniak 1 Stunde bei RT behandelt.

a) Ergebnisse des nicht nach P_R und P_{FR} getrennten Abbaus:

Die Chromsäurebehandlung bei RT führt u.a. zu zwei gut mit Chlor/Benzidin nachweisbaren und durch entsprechende Vergleichsproben identifizierbaren Substanzen. Bei der einen Substanz handelt es sich um Hämaminsäureimid (12); die andere Verbindung ist kein Imid, sondern Isatin (38). 38 zeigt eine geringfügig andere Anfärbung mit Benzidin als die Imide; die blaue Farbe hat einen Stich ins Graugrüne, während sich die Imide tiefblau anfärben. Isatin erscheint schon vor der Anfärbung mit Chlor/Benzidin auf der Platte als gelber Fleck und hat eine ausgeprägte UV-Absorption.



38

Zwei weitere Produkte des kalten Chromsäureabbaus zeigen ein schwer reproduzierbares Verhalten. Bei $R_F=0,50$ erscheint je nach eingesetztem Material eine mit Chlor/Benzidin leuchtend blau gefärbte bis braun verblassende Substanz. Da ihre Anfärbung von Versuch zu Versuch schwankt, ist es nicht sicher, daß es sich hierbei um ein Abbauprodukt des Chromophors handelt.

Bei $R_F=0,60$ schließlich erscheint an der Nachweisgrenze eine weitere Substanz. Bei nicht allen Versuchen konnte sie festgestellt werden. Möglicherweise sind dies Spuren von 2-Vinyl-3-methylmaleinimid (35); der R_F -Wert liegt etwas unter dem der Vergleichsprobe 35 (0,63), was durch eine hier wieder zu erwartende R_F -Depression erklärt werden könnte (vgl. Kap. 4.3.2.).

Die Behandlung des Proteinniederschlages mit Chromsäure bei 100° führt zu nur zwei mit Chlor/Benzidin nachweisbaren Verbindungen. Die eine davon ist wieder 12; die andere entspricht der bei kalter Chromsäurebehandlung aufgetretenen Substanz mit dem R_f von 0,50. Die Anfärbung ist in diesem Fall jedoch stets einheitlich blau, auch wenn eine von der gleichen Probe zuvor bei RT freigesetzte Substanz bei $R_f=0,50$ blaßbraun erscheint.

Die Behandlung des Proteinniederschlages mit Ammoniak bei RT führt zu E-2-Äthyliden-3-methylsuccinimid (5); anhand der definierten Vergleichsproben läßt sich die Menge an 5 abschätzen: 0,4 - 0,7 μ g entsprechend 15 - 30% Ausbeute d.Th.

Außerdem tritt hier wieder in minimalen Spuren eine Verbindung bei $R_f=0,60$ auf, wie sie schon bei Chromsäureeinwirkung in der Kälte aufgetreten war. Ihr Erscheinen ist so wenig reproduzierbar wie im Fall der oben beschriebenen Substanz. Es fällt jedoch auf, daß sie stets auch dann zu sehen ist, wenn bereits bei Chromsäurebehandlung in der Kälte eine Substanz mit gleichem R_f -Wert festgestellt werden kann (aus der gleichen Probe).

Schließlich zeigt die Behandlung des Proteinniederschlages mit Ammoniak bei 100° abermals ein neues Bild. Hier ist mit Chlor/Benzidin in großer Menge eine Substanz bei $R_f=0,50$ nachweisbar. Sie färbt sich blau mit gelbem Rand an und weicht im Farbton von den Imiden geringfügig ab. In kleinerer Menge tritt wieder 5 auf; die Ausbeute entspricht ziemlich gut der bei kalter Ammoniakbehandlung. Außerdem läßt sich eine Substanz am Startpunkt nachweisen.

b) Ergebnisse des nach P_R und P_{FR} getrennten Abbaus

Die Behandlung des Lyophilisats mit Chromsäure bei RT bringt für die beiden P-Formen die gleichen Ergebnisse. Sowohl bei P_R wie bei P_{FR} wird 12, 28 sowie die bei $R_f=0,50$ wandernde Verbindung (erst blau, dann mit der Zeit braun angefärbt) freigesetzt. Bei $R_f=0,60$ kann man keine Substanz erkennen.

Die Behandlung des Proteinniederschlages mit Ammoniak bei RT führt wieder bei beiden P-Formen zu 5. Darüber hinaus läßt sich hier aber nun in beiden Fällen bei $R_f=0,62$ eine Verbindung nachweisen, die durchaus ein Imid sein kann. Derartiges wurde schon bei Versuch (a), wenn auch schwer reproduzierbar, beobachtet.

Die Hydrolyse des Proteinniederschlages führt bei beiden Ansätzen zu 12 und der Substanz, die bei $R_f=0,50$ wandert und sich blau anfärben läßt.

4.4.3. Interpretation der Ergebnisse; Strukturaussagen für Phytochrom

Die Ergebnisse des Chromsäureabbaus sowohl bei RT als auch unter hydrolytischen Bedingungen weichen von den bisher bekannten Resultaten (86,38) ab. Beim Chromsäureabbau in der Kälte läßt sich nur ein einziges Abbauprodukt des Chromophors, Hämatinsäureimid (12), mit Sicherheit nachweisen. Das von RÜDIGER und CORRELL (88) gefundene 2-Äthyliden-3-methylsuccinimid (5) tritt nicht auf, dafür mit ähnlichem R_f -Wert wie 5 Isatin (38). Isatin entsteht durch Oxidation von Tryptophan oder Indolelessigsäure mit Chromsäure (113) und ist wahrscheinlich dem Fremdproteinanteil des eingesetzten Lyophilisats zuzuschreiben. Da einerseits 12 und 38 in vergleichbaren Mengen nachzuweisen sind und andererseits die dünnschichtchromatographische Analysetechnik (besonders durch Verwendung der dichter beschichteten DC-Fertigplatten) gegenüber der zitierten Arbeit verfeinert werden konnte, ist anzunehmen, daß das von RÜDIGER und CORRELL als 5 angesprochene Produkt der Chromsäurebehandlung in Wirklichkeit Isatin war. Aus hochgereinigtem nativen Phytochrom war bisher weder Isatin noch 5 nachzuweisen (85,86).

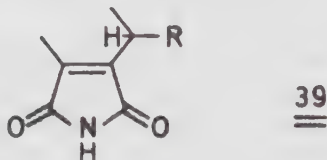
Die beim kalten Chromsäureabbau neben 12 und 38 nachweisbaren Substanzen bei $R_f=0,50$ und $R_f=0,60$ stehen möglicherweise in einem Zusammenhang. Frühere Ergebnisse (88,91) deuten darauf hin, daß Ring IV des Chromophors zwar frei vorliegt, aber vor allem bei höherem Fremdproteinanteil unter den Bedingungen des Chromsäureabbaus von funktionellen Gruppen des Proteins gebunden werden kann und sich so dem Nachweis bei kaltem Abbau entzieht.

So erhielten RÜDIGER und MUMFORD (91) bei kalter Chromsäurebehandlung von gut gereinigtem, nativem Phytochrom 2-Vinyl-3-methylmaleinimid (35) in Ausbeuten, die dafür sprachen, daß Ring IV frei vorliegen müsse; RÜDIGER und CORRELL (88) dagegen fanden unter den gleichen Bedingungen aus denaturiertem Phytochrom 35 nur in Spuren, dafür bei hydrolytischem Chromsäureabbau eine nicht näher identifizierte Substanz in größeren Mengen, von der sie annahmen, daß sie hauptsächlich das aus Ring IV erhältliche Abbauprodukt darstellte. Später (35) wurde diese unbekannte Substanz einem u.a. durch den Chromsäureabbau induzierbaren Artefakt zugeschrieben, wobei eine funktionelle Gruppe des Proteins an die ursprünglich freie Vinylgruppe addiert und unter hydrolytischen Bedingungen das Imid mit einem bestimmten Rest an C-2' als Bruchstück des Addukts in Freiheit gesetzt werden sollte.

Nun könnte die Substanz bei $R_f=0,60$ 2-Vinyl-3-methylmaleinimid (35) und die bei $R_f=0,50$ in wechselnden Ausbeuten und mit unterschiedlichen Farbnuancen auftretende Substanz ein Bruchstück solch eines Addukts an Ring IV sein, wie RÜDIGER und CORRELL es postulierten. Folgende Punkte sprechen dafür, daß sich ein Addukt auf Kosten von 35 bildet:

1. Der hohe Fremdproteinanteil kann unter Abbaubedingungen zur Addition der Vinylgruppe (85,91) führen.
2. Die Behandlung des Proteinniederschlages mit Chromsäure bei 100° führt neben 12 zu einer Verbindung mit $R_f=0,50$, die in etwa gleicher Ausbeute wie 12 auftritt und in diesem Fall in der Anfärbung wie ein Imid erscheint.
3. Bei Chromsäurebehandlung des Thioäthers 9 entstehen zwei Substanzen (30, 31) mit ähnlichen chromatographischen Eigenschaften wie die Sulfonisomeren 20a und 20b (s. Abb.14, S.61). Ihr Entstehen aus 9 durch Oxidation und Decarboxylierung der Aminosäurefunktion könnte analog zu dem Auftreten des Addukts an Ring IV erklärt werden. Bei 30 und 31 ($R_f=0,12$ und $0,20$) handelt es sich allerdings um Succinimide, bei der Substanz aus Phytochrom mit $R_f=0,50$ wahrscheinlich um ein Maleinimid.
4. Auch RÜDIGER und CORRELL (88) erhielten beim hydrolytischen Chromsäureabbau von Phytochrom eine Substanz mit etwa gleichen chromatographischen Eigenschaften.

Die Substanz bei $R_f=0,50$ könnte also ein Artefakt vom Strukturtyp 32 sein.



Ein geringer Teil von 32 könnte schon beim Kaltabbau freigesetzt worden sein, wobei die Tendenz zur Verfärbung durch den unbekannten Rest bei kleineren Mengen mehr zum Tragen kommt ($\rightarrow$ Bräunlich), die Hauptmenge aber würde erst die Hydrolyse liefern.

Die Bildung von 2-Äthyl-3-methylmaleinimid (24) kann bei Hydrolyse des Proteinniederschlages nicht beobachtet werden. Auch dies steht im Gegensatz zu den Ergebnissen von RÜDIGER und CORRELL bei denaturiertem Phytochrom.

Die Ergebnisse der Chromsäureabbauten lassen sich wie folgt zu-

sammenfassen:

Bei RT wird ein Ring des Chromophors ganz in Freiheit gesetzt ($\rightarrow$ 12), ein weiterer nur zum Teil und in zwei Fraktionen: in Spuren als 35 und z.T. als Artefakt (39). 12 kann aufgrund der Chromatabbauten von RÜDIGER und CORRELL Ring II, 35 und 39 im Sinne der oben beschriebenen Argumentation Ring IV zugeordnet werden.

Die Behandlung des Proteinniederschlages bei 100° setzt Ring III in Freiheit ($\rightarrow$ 12) und liefert die Hauptmenge von Ring IV als Artefakt ($\rightarrow$ 39). Ring I wird nicht frei; denn nach den Untersuchungen am Chromophor (45) ist dieser Ring hydriert und müßte als Succinimid abgespalten werden; Succinimide haben bei den angewandten chromatographischen Verfahren R_f -Werte $< 0,50$, so daß 39 als Abbauprodukt aus Ring I ausscheidet.

Das entscheidende Ergebnis der Abbauprobe bringt die Ammoniakbehandlung des Proteinniederschlages: 2-Äthyliden-3-methylsuccinimid wird in sterisch einheitlicher E-Konfiguration (5) gut nachweisbar sowohl bei RT als auch bei 100° in Freiheit gesetzt. Die Ausbeute ist nicht ganz so gut zu bestimmen wie bei den anderen Biliproteiden, ihre Größenordnung stimmt aber mit der bei Phycoerythrin und Phycocyanin festgestellten überein (vgl. Kap. 4.1.2. und 4.2.2.).

Damit ist die gleiche Proteinbindung an Ring I des Chromophors wie bei C-Phycoerythrin und C-Phycocyanin nachgewiesen: Die Thioätherverknüpfung an C-2¹ (40, 41).

Gleichzeitig ist damit das Ergebnis von GROMBEIN et al. (45) bestätigt, wonach Ring I hydriert vorliegt.

Der in Schema 14 für Phycocyanin angegebene Mechanismus des CrO_3/NH_3 -Abbaus läßt sich also auf Phytochrom übertragen, wenn man die Schwierigkeit, Ring IV nachzuweisen, auf Sekundäreffekte zurückführt. Die Spektralmessungen am nativen Phytochrom (44) und der Abbau von sehr reinem Material (91) deuten auf eine freie Vinylgruppe von Ring IV hin, so daß die Bindungsverhältnisse im nativen Phytochrom denen der anderen Biliproteide entsprechen dürften: Ring I und III sind kovalent mit dem Protein verknüpft, Ring II und IV liegen frei vor (40, 41).

Bei kalter Ammoniakbehandlung gibt der Proteinniederschlag in Spuren wieder eine Substanz bei $R_f=0,60$ frei, für die eine Interpretation schwerfällt. Möglicherweise handelt es sich wieder um 35, das aus dem Addukt mit dem Protein durch Ammoniak freigesetzt wird. Das würde bedeuten, daß die Vinylgruppe beim Denaturieren einer reversiblen Addition zu 39 mit R = Protein unterliegt und das Addukt

bei Ammoniakwirkung wieder zu 35 eliminiert.

Vielleicht handelt es sich hier um eine analoge Reaktion wie beim hydrierten Ring; die Thioladdition an 35 würde zu einer Chromophorverknüpfung führen, wie sie in den Cytochromen vorliegt (66), sie ist ebenso denkbar (vgl. Lit. 85, dort S.107) wie eine ammoniakalische Eliminierung des entsprechenden Sulfons^{*)}.

Offenbleiben muß, welcher Art die bei heißer Ammoniakbehandlung freigesetzte Verbindung mit $R_f=0,50$ ist. Da die Anfärbung ein wenig von der typischen Imidfärbung abweicht, wie sie z.B. die bei hydrolytischem Chromsäureabbau auftretende Substanz mit $R_f=0,50$ aufweist, kann es sich auch um eine nicht aus dem Chromophor stammende Verbindung handeln.

Alle Abbauergebnisse gelten sowohl für P_R wie für P_{FR} . Damit ist nachgewiesen, daß in beiden Phytochrom-Formen Ring I hydriert vorliegt und über einen Thioäther an C-2¹ mit dem Protein verknüpft ist. Es scheidet also auch eine mit der Photoreversion einhergehende Isomerisierung der Methin-Doppelbindung zwischen Ring I und II zu einer endocyclischen Doppelbindung zwischen C-1 und C-2 aus, wie sie von KÖST (53) für die Umlagerung von Mesobilirrhodin in Urobilin vorgeschlagen und von GROMBEIN (44) auch für die Phytochromumwandlung diskutiert wurde.

Nach den Versuchen von GROMBEIN et al. (45) ist ein Unterschied im Chromophor an der Methinbrücke zwischen Ring I und II in der Weise wahrscheinlich, daß P_R hier eine Doppelbindung wie die Chromophore der Algenfarbstoffe aufweist, während bei P_{FR} das konjugierte System nicht über die endocyclischen Doppelbindungen von Ring II hinausgeht.

Daraus ergibt sich für P_R die Struktur 40 und für P_{FR} die Struktur 41.

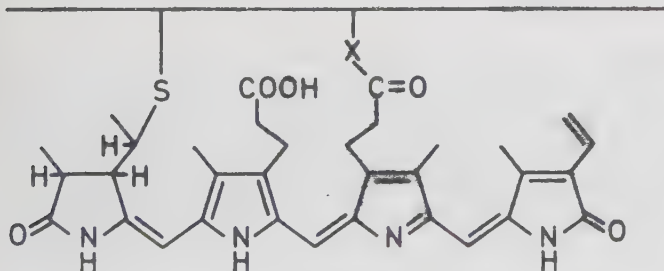
Den einzigen Hinweis auf das Vorliegen einer Thioätherverknüpfung des Proteins mit dem Chromophor lieferte bisher die Untersuchung eines Chromopeptid-Fragmentes, in dem Cystein und Serin nachgewiesen wurden, durch FRY und MUMFORD (34), wobei die Autoren die Tatsache, daß Cystein nur mit dem Faktor 0,6 bei der Aminosäureanalyse nachzuweisen war, als Indiz einer Thioätherbindung mit dem Chromophor ansahen. Der dort von der Seite des Proteinanteils wahrscheinlich gemachte Thioäther wurde im Gegensatz zu den hier beschrie-

*) Um dies aufzuklären, müßte man die Serie der Modellversuche mit 35 auf 35 übertragen, wozu synthetisches 35 in größeren Mengen erforderlich wäre.

benen Resultaten in Analogie zu den Cytochromen in α -Stellung einer an einem Fünfring mit endocyclischer Doppelbindung sitzenden Äthylgruppe, aufgrund der Strukturaussagen von RÜDIGER und CORRELL (88) also an Ring IV des Chromophors angenommen.

Es muß an dieser Stelle hervorgehoben werden, daß hier zum ersten Mal der Nachweis von Ring I des Phytochrom-Chromophors geglückt ist und daß nur dadurch eine Strukturaussage mit Berücksichtigung der Proteinbindungen möglich wurde. Der entscheidende Schritt zur Strukturaufklärung an Ring I war die Anwendung des kombinierten CrO_3/NH_3 -Abbaus, da bei dem schwer zu reinigenden Biliprotein mit einem ungünstigen Chromophor-:Protein-Verhältnis nur die Spezifität des Abbaumechanismus überhaupt zu einem Ergebnis führte: Das Phytochrom ist denn auch das einzige der untersuchten Biliproteide, bei dem der ansonsten bewährte hydrolytische Chromsäureabbau kein Resultat für Ring I des Chromophors brachte.

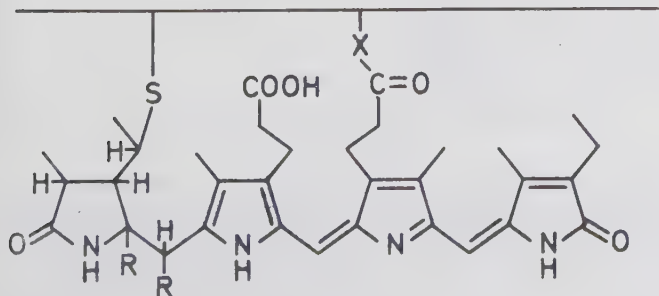
Protein



Struktur des
Chromophor-Bereichs
von P_R

40

Protein



Struktur des
Chromophor-Bereichs
von P_{FR}

41

4.5. Sterische Aussagen für die Biliproteide

Einen Anhaltspunkt für die sterischen Verhältnisse am hydrierten Ring I im nativen Biliproteid stellen die aus diesem Ring erhaltenen Abbauprodukte dar: Der CrO_3/NH_3 -Abbau führt bei C-Phycocyanin und C-Phycocerythrin zu 5 und minimalen Spuren von 6. Beim Phytochrom ist die Gesamtmenge des Abbauproduktes aus Ring I so gering, daß - unter der Annahme der gleichen sterischen Relationen zwischen 5 und 6 wie bei den Algenfarbstoffen - 6 ohnehin jenseits der Nachweisgrenze liegt.

Das Verhältnis der beiden Isomeren 5 : 6 aus Ring I des Chromophors ist mit Sicherheit $> 20:1$ und läßt aufgrund der Untersuchungen an den Modellimiden den direkten Schluß zu, daß die sterische Konfiguration der von Modelltyp A (trans/ α) entspricht.

Dabei erscheint besonders die relative Konfiguration an der Äthylgruppe als solche von Typ α (R,R oder S,S) gut gesichert. Nicht zuletzt die Röntgenstrukturanalyse hat den Zusammenhang zwischen Eliminierungsprodukt und relativer Konfiguration an der Äthylgruppe bestätigt.

Die relative Konfiguration zwischen C-1 und C-2 wird in Analogie zu den Verhältnissen am gut untersuchten Sulfon 20 und wegen der anhand der übrigen Modellimide erkannten sterischen Tendenzen bei verschiedenen Substituenten als trans-Konfiguration angenommen. Darüber hinaus gibt es eine Reihe von Analogien aus dem Bereich der nativen Tetrapyrrolsysteme. So wurde die trans-Konfiguration an hydrierten Ringen in Stercobilin (13,43), in Chlorophyllen (28,30) und in Bacteriochlorophyllen (9,10) nachgewiesen.

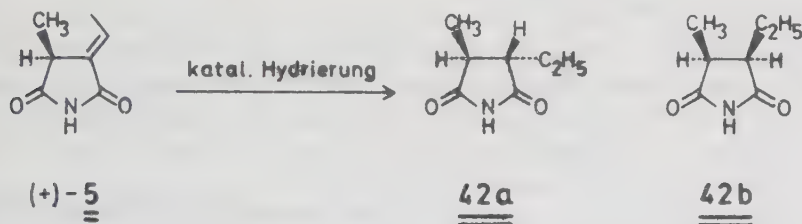
Aus der Kenntnis der relativen Konfigurationen folgt gemäß Tabelle 4 (S.51), daß an allen drei Asymmetriezentren von Ring I in den Chromophoren der Biliproteide die gleiche absolute Konfiguration vorliegt. Dabei hat der Übergang von Imiden zu Bilinen keine Auswirkung auf die Zuordnung der absoluten Konfiguration an C-2, da der Stickstoff in Bilinen (in Richtung C-2') ebenso wie der Sauerstoff in Imiden Priorität gegenüber Kohlenstoff (in Richtung C-1) aufweist (19).

Die absolute Konfiguration scheint bei den Bilinen bzw. Biliproteiden stets einheitlich festgelegt zu sein. KNOBLOCH (12,52) konnte zeigen, daß aus (+)-2(E)-Äthyliden-3-methylsuccinimid (5) bei katalytischer Hydrierung u.a. das bereits früher charakterisierte (14) (-)-trans-2S-Äthyl-3S-methylsuccinimid (42a) entsteht, so daß

(+)-5 an C-3 stets S- und (-)-5 R-konfiguriert sein muß (Schema 16).

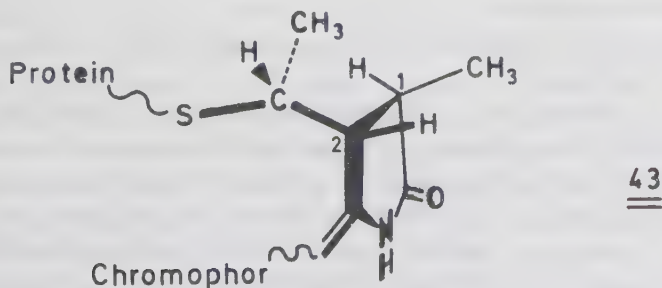
Aus Phycobiliverdin (2) erhielt er durch Chromsäureabbau (-)-5. RÜDIGER (82) erhielt aus Aplysioviolin, einem Gallenfarbstoff mit gleichem konjugierten System wie Phycobiliviolin (2), ebenfalls (-)-5.

Da das Aplysioviolin, das RÜDIGER im Abwehrsekret des Seehasen *Aplysia* fand (79,80), aus dem Phycoerythrin der Nahrung des Seehasen stammt (20), gilt somit sowohl für den roten (nach Abspaltung aus dem Protein → Phycobiliviolin (2)) als auch für den blauen (nach Abspaltung → Phycobiliverdin (2)) Chromophor der Algenfarbstoffe die R-Konfiguration an C-1.



Schema 16 (Lit. 52)

Aus diesen Überlegungen läßt sich die absolute Konfiguration mit großer Wahrscheinlichkeit für Phycoerythrin und Phycocyanin angeben: Beide untersuchten Biliproteide weisen sowohl an C-1 als auch an C-2 und an C-2¹ des Chromophors R-Konfiguration auf (43). Dieselbe absolute Konfiguration gilt wahrscheinlich auch für Phytochrom.



Eine Ausnahme von den bei allen nativen Biliproteiden für Ring I gefundenen Abbauresultaten stellen die Ergebnisse des Abbaus von zweigipfligem C-Phycoerythrin dar. Diese Tatsache erlaubt einige interessante Schlußfolgerungen.

Die Freisetzung von Ring I in Form von 5 durch Chromsäure bei RT kann auf zwei Arten erklärt werden:

1. An der Äthylgruppe findet im Rohextrakt ohne intermediäre Lösung der Thioätherbindung eine Epimerisierung statt, die zu einer relativen Konfiguration führt, bei der die Eliminierung erleichtert ist. Da für das native eingipflige C-Phycoerythrin Modelltyp A (trans/ α) abgeleitet wurde, würde eine Epimerisierung an C-2 im Rohextrakt bedeuten, daß Typ D (cis/ β) entsteht. Um für diesen Isomerentyp eine erleichterte Eliminierung anzunehmen, die dann zu 5 führt, müßte ein gänzlich anderer Eliminierungsmechanismus als für stereoselektive E₂-Eliminierungen üblich angenommen werden.

Das gleiche gilt für eine Epimerisierung im Rohextrakt an C-2¹: Aus trans/Typ α würde trans/Typ β , und das Freisetzen von 5 ließe sich nur mit einem anderen Mechanismus erklären. Deshalb erscheint eine Epimerisierung im Rohextrakt ohne vorherige Eliminierung als sehr unwahrscheinlich.

2. Die Proteinbindung ist teilweise aufgehoben, Ring I mit der Konfiguration von Modelltyp A dabei zur E-konfigurierten Äthylidenbindung eliminiert. Diese Vorstellung steht mit der Neigung der Thioäther zur reversiblen Spaltung in Einklang. Es müßte dann ein Chromophor mit Äthylidengruppe zum gleichen Prozentsatz am Gesamtchromophorgehalt beteiligt sein, wie Ring I durch Chromsäure bei RT freigesetzt wird. Dafür gibt es keine Hinweise aus Spektralmessungen; doch andererseits ist nicht sicher, ob ein Anteil von weniger als 10% zur signifikanten Änderung des spektralen Verhaltens führt.

Nun kann man das sterische Verhalten von zweigipfligem C-Phycoerythrin bei der Eliminierung mit Ammoniak, wo verstärkt 6 auftritt, besser erklären, wenn die Proteinbindung im gealterten Material teilweise aufgehoben ist, und zwar in folgender Weise: Wenn man als Folgeerscheinung einer proteolytischen Verkleinerung des Moleküls die Lösung der Thioätherbindung und einen Positionswechsel des Chromophors annimmt, dann ist bei der Neuorientierung des freien Ringes I eine weniger stereospezifische Thioladdition an die Äthylidenbindung - nämlich von beiden Seiten - möglich als dies für die Biosynthese zutrifft. Nach den Regeln der Stereochemie würde sich daraus ergeben, daß nun im zweigipfligen C-Phycoerythrin keine einheitliche relative Konfiguration an der Äthylgruppe mehr ausgebildet ist, sondern beide Typen von relativen Konfigurationen

(α und β) entstehen, die dann beim CrO_3/NH_3 -Abbau zu den Eliminierungsprodukten 5 und 6 führen (vgl. Schema 9, S.52 und Schema 10, S.56). Da die angulare trans-Konfiguration bei einer Thioladdition aus sterischen Gründen vorausgesetzt ist (vgl. Kap. 3.6.3. und 3.8.2.), würden also die Isomerentypen A und B vorliegen.

Für die voluminösen Thiole war bei den Imiden eine bevorzugte Additionsrichtung postuliert worden, die bei E-konfigurierter Äthylidenbindung zu Typ A führen sollte (Kap. 3.7.3.). Da die sterischen Bedingungen für eine Addition an der Äthylidengruppe im Farbstoff, insbesondere im Biliproteid, jedoch nicht direkt mit denen im Imid gleichgesetzt werden können und 6 aus zweigipfligem C-Phycoerythrin im Vergleich zu 5 nur in geringer Menge entsteht, ergibt sich deshalb kein Widerspruch zwischen den Modellversuchen und dem Postulat einer beidseitigen Thioladdition an die Äthylidenbindung bei Proteolyse von C-Phycoerythrin.

4.6. Schlußbetrachtung

Die an synthetischen Succinimiden entwickelte Modellreaktion läßt sich mit guter Kongruenz auf eine Reihe von Biliproteiden übertragen. Die Spezifität der Reaktionsfolge unter milden Bedingungen garantiert auch in schwierigen Fällen die Verifizierung der Thioätherfunktion an der Äthylgruppe des hydrierten Fünfrings. Umgekehrt lassen die Ergebnisse des Chromsäure- und des CrO_3/NH_3 -Abbaus von Biliproteiden Rückschlüsse darüber zu, welche der synthetischen Imide einen besonders guten Modellcharakter aufweisen. Dabei hat sich gezeigt, daß die Modellimide mit Cystein und Cysteinderivaten am Thioäther (9, 22, 23) die beste Übereinstimmung mit den Biliproteiden zeigen.

Diese Übereinstimmung fordert nunmehr zu der Annahme heraus, daß die an den "größeren" Modellimiden in starkem Maße beobachtete Reversibilität der Thioätherverknüpfung auch für die Biliproteide gilt, d.h. daß auch in den Biliproteiden ein Gleichgewicht zwischen Thioäther und freier Thiolgruppe vorliegt.

Die Veränderung der Daten von C-Phycoerythrin, die ein längeres Verweilen des Biliproteides im Algenrohextrakt mit sich bringt, kann in der gleichen Weise gedeutet werden (s. Kap. 4.2.3.). Auch die Abbauergebnisse des Chromopeptids aus Phycoerythrin sprechen für eine relativ leichte Eliminierbarkeit des Thioäthers (s. Kap. 4.3.3.).

Man kann nun zwischen diesen Eigenschaften des Thioäthers und dem Auftreten zweier verschiedener spektraler Typen beim Phytochrom folgenden Zusammenhang vermuten:

Die Umwandlung von P_R zu P_{FR} könnte durch eine (möglicherweise lichtinduzierte) intermediäre Lösung der Thioätherbindung eingeleitet werden; die Aufhebung einer Proteinbindung würde dann einen "Chromophor-Sprung" in eine andere Proteinnische ermöglichen, wo durch Thioladdition der ursprüngliche Thioäther wiederhergestellt wird (Schema 17).

Die Reversibilität der Thioladdition wäre demzufolge die chemische Voraussetzung der biologisch so außerordentlich bedeutsamen Photo-reversibilität von Phytochrom.

Die Vorstellung von einer Verlagerung des Chromophors im Protein wird durch die Tatsache gestützt, daß P_{FR} längerwellig absorbiert als P_R , obwohl denaturiertes P_{FR} einen Chromophor mit kürzerer Konjugation besitzt (45). Die langwellige Absorption von P_{FR} läßt sich deshalb so erklären, daß im P_{FR} der Chromophor als Anion (44,88), im P_R dagegen als Kation vorliegt (44). Dieser Wechsel vom Kation zum Anion wird auf alle Fälle durch einen Wechsel der Proteinumgebung begünstigt.

Der Verlust einer Doppelbindung beim denaturierten P_{FR} gegenüber dem P_R (44,45) spricht nicht gegen den Mechanismus der Umlagerung, da noch nicht geklärt ist, ob es sich hierbei um einen Artefakt der Denaturierung oder eine native Photo-Oxidation bzw. -Addition handelt.

So könnte die Tatsache, daß beim zweigipfligen C-Phycoerythrin die Veränderung der spektralen Eigenschaften wahrscheinlich mit einer Chromophor-Umlagerung Hand in Hand geht (vgl. Kap. 4.2.3.), für das Phytochrom Modellcharakter besitzen. Im zweigipfligen C-Phycoerythrin ist die partielle Thioätherspaltung durch den Nachweis von $\underline{5}$ beim Chromophor-Abbau in Chromsäure bei RT wahrscheinlich gemacht.

Es ist deshalb durchaus möglich, daß auch beim kalten Chromsäureabbau von photoreversiblen Phytochrom im Licht Ring I in Spuren freigesetzt wird. Um dies nachzuweisen, müßte man allerdings größere Mengen von reinem Phytochrom untersuchen.

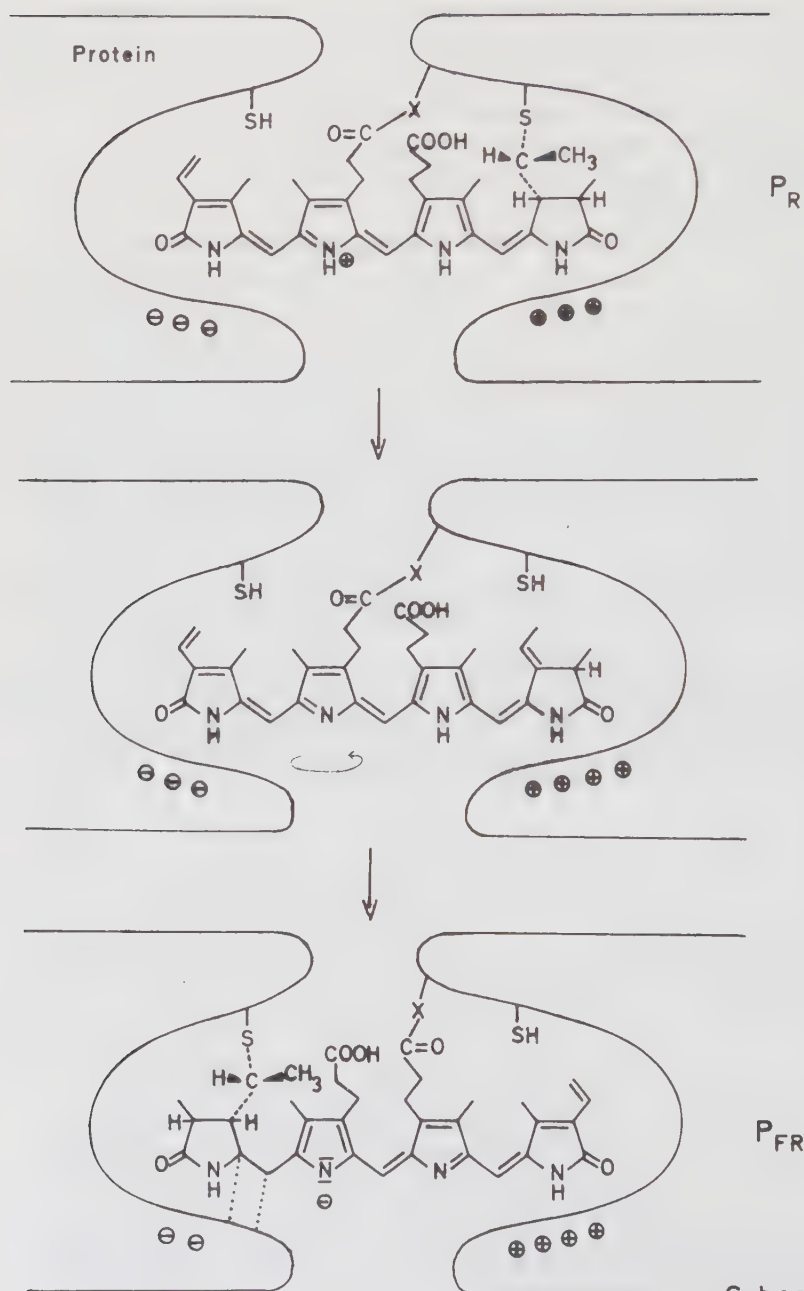
Sicher keinen Modellcharakter für Phytochrom besitzt die aus dem CrO_3/NH_3 -Abbau abgeleitete partielle Konfigurationsumkehr an $C-2^1$ beim Übergang von eingipfligem zu zweigipfligem C-Phycoerythrin

(Kap. 4.2.3.). Falls die Umwandlung $P_R \rightarrow P_{FR}$ tatsächlich mit der Readdition eines Thiols an die intermediär freie Äthylidenbindung verbunden ist, sollte man einen sterisch einheitlichen Verlauf, mit- hin nur eine bestimmte Konfiguration an dieser Stelle beim P_{FR} erwarten. Da der CrO_3/NH_3 -Abbau von Ring I bei P_R wie bei P_{FR} in gleicher Menge 5 liefert, ist die gleiche Konfiguration bei beiden P-Formen nachgewiesen.

So stände bei der möglichen Thioäthereliminierung im Biliproteid der unspezifischen Proteolyse von C-Phycoerythrin mit daraus resultierender uneinheitlicher Konfiguration an der Äthylgruppe von Ring I die spezifische (da auch physiologisch bedeutsame) Umwandlung des Phytochroms mit Erhalt der Konfiguration gegenüber.

Die Versuche an Modells-substanzen und Biliproteiden (einschließlich Phytochrom) lassen das in Schema 17 dargestellte Modell für die Photoreversion von Phytochrom, möglich erscheinen. Dabei wird für das in P_{FR} vorliegende Anion die Deprotonierung des Stickstoffs von Ring II angenommen, weil

- a) das Proton am Pyrrol-Stickstoff - der in Ring II annähernd vor- liegt - saurer ist als das eines Pyrrolidons (in Ring I) und eines Pyrrolinons (in Ring IV),
- b) das Anion aufgrund der Absorption von P_{FR} am konjugierten System partizipieren muß, was unter Berücksichtigung der Daten von GROMBEIN et al. (45) die Lokalisierung an Ring I ausschließt.



Schema 17

5. Experimenteller Teil

5.1. Methoden und Geräte

5.1.1. Dünnschichtchromatographie

a) Material

Die meisten Arbeiten wurden mit selbst hergestellten Platten durchgeführt. Dazu wurden Arbeitsgeräte (Streichgerät, Schablone etc.) von der Firma DESAGA (Heidelberg) verwendet. Die Beschichtung der Platten erfolgte nach STAHL (100). Als Sorbentien wurden Kieselgel G und Kieselgel GF₂₅₄ (Fa. MERCK, Darmstadt) für die Imide sowie Polyamid und Cellulose (Fa. MACHEREY und NAGEL, Düren) für die Farbstoffe benutzt. Als Schichtdicke wurden 0,25 mm (für analytische Zwecke) und 2 mm (für präparative Zwecke) gewählt. Für die DC der Chromsäureabbauten von Phytochrom und des Bilipeptids wurden HPTLC-Fertigplatten Kieselgel 60 F 254 (Nr. 5628) der Fa. MERCK verwendet.

b) Fließmittel

Alle zur Anwendung gekommenen Fließmittel sind in Tabelle 6 zusammengestellt.

Tabelle 6: Zusammenstellung der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Fließmittel

Fließmittel	Bestandteile	Zusammensetzung				
I a-e	Tetrachlorkohlenstoff/ Äthylacetat/ Cyclohexan	6	7	15	4	3
		3	2	3	4	6
		1	1	1	1	1
II a-d	Benzol/ Dioxan/ Eisessig	18	100		100	100
		2	8		8	8
		1	0,15		0,3	3
III	n-Butanol/Eisessig/H ₂ O	3	/	1	/	1
IV	n-Butanol/Chloroform	1	/	1		
V a,b	n-Butanol/ n-Butylacetat/ Eisessig/ Wasser	1	1			
		2	1			
		2	1			
		1	1			
VI a-c	Chloroform/ Methanol/ Ammoniak (17%)	2	2	4		
		2	4	6		
		1	1	1		
VII	Methanol/H ₂ O/Ammoniak(17%)	9	/	2	/	1
VIII	Chloroform/Methanol/Eisessig	60	/	5	/	1

Standardfließmittel für die Imide war I d. Bei den Abbauten der Biliproteide wurden I d (zur Trennung aller Imide außer Hämatisäureimid (12), welches schmiert) und II a (zur Chromatographie von 12 in etwa ein Drittel der Höhe von Fließmittel I d) kombiniert.

c) Markierung

1. Chlor/Benzidin (76): Zur Anfärbung der Imide wurde die Platte etwa 5 Minuten in eine Chlorkammer gestellt und anschließend mindestens 2 Minuten im kräftigen Luftstrom abgeblasen. Dann wurden die Imide durch Besprühen mit einer 0,3 proz. Lösung von Benzidin in Methanol tiefblau angefärbt.
2. Ninhydrin: Die Imide mit Aminosäurefunktion (auch verestert) wurden sowohl mit Chlor/Benzidin als auch mit Ninhydrin nachgewiesen.
3. Kaliumpermanganat: Zur Unterscheidung von Malein- und Succinimiden wurden die DC-Platten mit einer 1,5 proz. Lösung von KMnO_4 in Wasser besprüht. Die polare exocyclische Doppelbindung bei Succinimiden gibt keine so kräftige Reaktion mit Permanganat wie die Maleinimide.
4. UV: In der Regel wurden alle Platten vor der Markierung auf ihre Fluoreszenzlöschung bei $\lambda = 254 \text{ nm}$ und Fluoreszenz bei $\lambda = 350 \text{ nm}$ untersucht. Dazu diente eine Universal-UV-Lampe der Fa. CAMAG (Berlin), Typ TL-900. Bei 350 nm zeigt besonders das 2-Vinyl-3-methylmaleinimid (35) eine deutliche Fluoreszenz. Fluoreszenzlöschung bei 254 nm zeigen alle Maleinimide (stärker) und Succinimide (schwächer, mit Doppelbindung etwas stärker).

5.1.2. Gaschromatographie der Imide

Die quantitative Gaschromatographie der Imide wurde an einem Varian aerograph, series 1800, durchgeführt. Zur GC-MS-Kopplung war ein Gaschromatograph JGC-20 KP der Fa. JEOL (Tokyo) an das Massenspektrometer angeschlossen. In beiden Fällen wurden die gleichen Bedingungen eingehalten:

Die Säule aus Metall (1m x 3,3mm) war mit 10% SE 30 Gaschrom Q 80-100 mesh gefüllt. Injektionstemperatur: 240-250°. Detektortemperatur: 240-250°. Die Säule wurde mit einem Temperaturprogramm betrieben. Anfangstemperatur war 100°, dann wurde pro Minute um 10° aufgeheizt. Die Standard-Durchflußgeschwindigkeit des Stickstoffs betrug 20 square/inch. Detektor war ein FID, der mit 200 ml Luft/min und 30 ml H_2 /min betrieben wurde.

5.1.3. Präparative Säulenchromatographie

a) Trennung von Imiden an Kieselgel 60

Zur präparativen Trennung der Imide wurden Säulen mit Kieselgel 60 reinst, Korngröße 0,063-0,200 mm (Fa. MERCK) verwendet. Die besten Trennungen wurden erzielt, wenn Säulen mit 3,2 cm Durchmesser mindestens 30 cm hoch gefüllt waren. Es wurden nur neutrale Fließmittel eingesetzt (Ia und Id). Als optimale Tropfgeschwindigkeit erwiesen sich 2,5-3,5 Sekunden für einen Tropfen. In einem Fraktionssammler Mini Escargot der Fa. GILSON wurden Fraktionen zu je 800 Tropfen aufgefangen und in der DC auf Imide untersucht.

b) Trennung von Biliproteiden durch Gelfiltration an Sephadex-G-100 und -G-200

Die Gelfiltrationen wurden in der Kühlkammer bei 4° durchgeführt. Sie wurden gegen die Schwerkraft betrieben. Die Säulen wurden vor der Trennung jeweils zwei Tage lang mit dem entsprechenden Puffer equilibriert. Zur G-100-Gelfiltration wurden größere Säulen (z.B. 60 x 10 cm ϕ) als zur Trennung an G-200 (z.B. 80 x 5 cm ϕ) verwendet. Zwischen Säulen und Fraktionssammlern wurden in Durchflußphotometern die Transmissionen der Lösungen gemessen. Die Eluate wurden im gleichen Fraktionssammler wie unter (a) in Fraktionen zu je 200 Tropfen aufgefangen.

c) Trennung von Biliproteiden durch Ionenaustauscherchromatographie an DEAE-Cellulose und DEAE-Sephadex (98)

Auch diese Trennungen wurden bei 4° durchgeführt. Sie erfolgten mit der Schwerkraft. Säulengröße: 20 x 2,5 cm ϕ . Auf die acht Stunden equilibrierten Säulen wurden die Lösungen aufgetragen, einen Tag mit Startpuffer gewaschen und mit einem Gradient aus 250 ml Startpuffer und 250 ml 0,3 M KCl (bei Algenfarbstoffen) bzw. 0,6 M KCl (bei Phytochrom) im Startpuffer eluiert. Transmissionsmessung und Sammlung der Eluate wie unter (b).

5.1.4. Geräte zur Aufnahme von Spektren

a) Spektralphotometer für UV und sichtbares Licht

Bei der Isolierung von Phytochrom kam das 2-Strahl-Spektralphotometer DMR 22 mit Doppelmonochromator der Fa. ZEISS (Oberkochen) zum Einsatz. Für die Spektren der Biliproteide wurden das Spektralphotometer DB-GT der Fa. BECKMAN und das Spektralphotometer UNICAM

SP 1800 herangezogen. Die Transmission von Säuleneluataten wurde bei 280 nm mit dem Durchflußphotometer Uvicord II der Fa. LKB (Bromma/Schweden) gemessen.

b) IR-Spektralphotometer

Die IR-Spektren wurden mit einem BECKMAN-Spektralphotometer IR-33 gemessen.

c) Massenspektrometer

Die Aufnahme der Massenspektren erfolgte mit dem Massenspektrometer JMS-D 100 der Fa. JEOL (Tokyo) mit Direkteinlaßsystem sowie GC-MS-Kopplung.

d) NMR-Spektrometer

Die Protonenkernelnresonanzspektren wurden mit einem VARIAN-Kernresonanzspektrometer HA-100 mit TMS als innerem Standard gemessen.

5.1.5. Sonstige apparative Voraussetzungen

a) Zentrifugen

Als Zentrifugen standen die Kühlzentrifuge Typ G 50 K der Fa. WKF (Brandau), eine Ultrazentrifuge Typ 65 000 Upm von WKF und eine Tischzentrifuge Typ Junior I der Fa. CHRIST (Osterode) zur Verfügung. Die Ernte der Algen erfolgte im Durchflußrotor bei 10 000 Upm (13 000 g), und die AS-Niederschläge wurden im 6x250 ml-Rotor bei 16 000 Upm (40 000 g) abzentrifugiert. Die Ultrazentrifuge wurde bei 30 000 Upm (60 000 g) betrieben. Die Tischzentrifuge genügte bei der Sedimentation von Proteinniederschlägen beim Chromsäureabbau (Stufe 10: 3 000 g).

b) Elementaranalyse

Elementaranalysen wurden mit dem Gerät "Elemental Analyzer Mod. 1102" der Fa. CARLO ERBA (Mailand) durchgeführt.

5.2. Belichtungsversuche

Als Lichtquelle diente eine Hochdruckquecksilberlampe HPK 125 W von der Fa. PHILIPS, die ein breites Emissionsspektrum im UV $\lambda > 240$ nm mit maximaler Intensität im nahen UV (360-370 nm) besitzt. Die Lampe war von einem Kühlmantel aus Quarzglas, welcher für das Spektrum der Lampe quantitativ durchlässig ist, umgeben.

5.2.1. Photoaddition

a) Bestrahlung und präparative DC der Produkte

60 mg (0,1 mMol) Bilirubin wurden in 60 ml Chloroform und 60 mg (0,4 mMol) N-Acetyl-cystein bzw. 38 mg (0,25 mMol) Cystein-methylester in 10 ml Methanol gelöst und beide Lösungen vereinigt. Die Versuche wurden sowohl in neutraler wie in stark saurer Lösung (methanol. HCl) durchgeführt. In die Lösung wurde die Lampe eingetaucht und nach 20 Minuten Strahlungsdauer (vgl. Lit. 64: 1 h) bei 35° wieder entfernt. Nach Einengen der Lösung wurde sie in präparativer DC an Polyamid/Cellulose (5/1) aufgetrennt. Von den in der DC entstehenden farbigen Zonen wurden fünf Bereiche mit Methanol eluiert:

- I: $R_f = 0,8 - 1$ gelbgrün
II: $R_f = 0,6 - 0,8$ grüngelb
III: $R_f = 0,5 - 0,6$ grün-türkis
IV: $R_f = 0,4 - 0,5$ türkis-violett
V: $R_f = 0,3 - 0,4$ grün

b) Chromsäureabbau der Bestrahlungsprodukte

Die eingeeengten Eluate wurden mit je 50 ml Chromsäure (1% CrO_3 /2n H_2SO_4) eine Stunde bei RT behandelt. Anschließend wurde sowohl im Sauren als auch bei pH=7 mit je 10 ml Äthylacetat extrahiert. Die DC der Extrakte ergab, daß in den Zonen III - V keine Imide außer Hämatinsäureimid (12), dessen Methylester (13) sowie 2-Vinyl-3-methylmaleinimid (35) auftraten. Bei den Zonen I und II führte der Chromsäureabbau zu 12, 12, 35, 2-(1-Methoxyäthyl)-3-methylsuccinimid (17) sowie dem Thioäther 11. 11 war nur durch Extraktion bei pH=7 erhältlich und wurde mit Chlor/Benzidin sowie Ninhydrin nachgewiesen.

5.2.2. Photolyse des Thioäthers 11

Ein Teil des Äthylacetat-Extraktes der Abbaulösung (etwa 20 ml) wurde zwei Stunden bei 30 - 40° bestrahlt; dabei bildete sich ein Niederschlag, der in der DC getestet wurde. Gleichzeitig wurden Bilirubin (1) und Cystein-methylester ebenfalls zwei Stunden bestrahlt (s. Kap. 5.2.1.a). Die Pigmentlösung wurde dann wieder mit Chromsäure abgebaut und der Extrakt in der DC mit dem bestrahlten Extrakt verglichen.

Das bei der Photolyse von 11 gebildete 5 wurde in präparativer DC

isoliert und durch MS charakterisiert (Tabelle 7, sowie Abb. 1, S. 13).

Tabelle 7: Massenspektrum von E-2-Äthyliden-3-methylsuccinimid (5), das bei Photolyse des Thioäthers 11 entsteht; 75 V, 95°/130°; s. Abb. 1, S. 13.

m/e	rel.Intens. (%)	m/e	rel.Int. (%)	m/e	rel.Int. (%)
139 (M ⁺)	28	55	8	40	25
97	7	53	46	39	46
96	64	52	11	38	13
69	12	51	14	37	6
68	100	50	9	29	7
67	93	44	7	28	11
66	11	43	11	27	29
65	12	42	14	26	8
63	7	41	35	18	9
57	7				

5.2.3. Bestrahlung von Imiden

Da von den eingesetzten Imiden z.T. nur sehr geringe Mengen zur Verfügung standen, wurden die Imide in kleinen Reagenzgläsern (5 cm lang) neben dem Kühlmantel der UV-Lampe bestrahlt. Das Material der Reagenzgläser (DURAN 50) ist im UV-Bereich < 290 nm zwar undurchlässig, aber da die Schicht zwischen Lampe und Lösung nur sehr dünn war, kann angenommen werden, daß auch fernes UV (240 - 290 nm) bei der Bestrahlung wirksam war (vgl. auch Lit. 93).

Die Imide wurden in neutraler methanolischer Lösung der Bestrahlung ausgesetzt. Die Dauer der Bestrahlung wurde variiert: 20 Minuten, eine Stunde und zwei Stunden. Die auftretenden Effekte waren bei zweistündiger Bestrahlung am ausgeprägtesten. Nach Beendigung der Bestrahlung wurden die Lösungen sofort direkt auf DC-Platten aufgetragen.

Das bei Bestrahlung von 24 gebildete 5 wurde in präparativer DC isoliert und durch MS charakterisiert (Tabelle 8).

Tabelle 8: Massenspektrum von E-2-Äthyliden-3-methylsuccinimid (5), das bei UV-Bestrahlung von 2-Äthyl-3-methylmaleiminid (24) in neutralem Methanol entsteht; 75 V, 90°/200°.

m/e	rel.Int. (%)	m/e	rel.Int. (%)	m/e	rel.Int. (%)
160	3	67	63	41	24
149	4	66	6	40	15
140	6	65	6	39	27
139 (M ⁺)	58	59	6	38	7
129	3	57	9	32	8
124	3	55	6	29	4
97	10	53	35	28	29
96	100	52	6	27	18
85	4	51	7	26	4
83	3	50	4	18	25
81	3	47	4	17	7
71	5	44	5	15	4
69	11	43	8		
68	71	42	9		

5.2.4. UV-Einfluß auf die Thioladdition an 5/6 und 24

Zu 5 mg (0,04 mMol) 5 in 10 ml Methanol wurden 10 Tropfen (0,1 ml = 0,7 mMol) Äthanthiol gegeben, die Lösung in vier Äquivalente geteilt, zu zwei Proben je 0,5 ml 25 proz. Ammoniak gegeben und je eine neutrale und ammoniakalische Probe zwei Stunden im UV bestrahlt.

Ebenso wurden 5 mg (0,04 mMol) 24^{*)} in 10 ml Methanol mit 10 Tropfen Äthanthiol versetzt, die Lösung in vier Äquivalente geteilt, zu zwei Proben je 0,5 ml Natriummethylat gegeben und je eine neutrale und basische Lösung zwei Stunden im UV bestrahlt.

Die vier bestrahlten Proben wurden wie die vier Vergleichsproben direkt auf die DC-Platte aufgetragen.

5.3. Synthese von Succinimiden

5.3.1. 2-Acetyl-3-methylbernsteinsäure-diäthylester (16) (21)

20,7 g (0,9 Mol) Natrium wurden in 600 ml wasserfreiem Äthanol gelöst. Zu der auf 30 - 40° gehaltenen Lösung des Äthylats wurden 114 ml (0,9 Mol) Acetessigsäureäthylester in 114 ml wasserfreiem Benzol getropft. Danach wurden langsam 113 ml (1 Mol) 2-Brompro-

*) Für die Überlassung von 24 danke ich Herrn Dr. H.-P. KÖST

pionsäure-äthylester zugetropft, wobei Natriumbromid ausfiel. Gegen Ende der Zugabe wurde zum Sieden erhitzt. Nach fünf-stündigem Kochen hatte die Lösung ca. pH=6. Nach Abkühlen wurde vom Niederschlag abgesaugt, das Filtrat i. Vak. eingeeengt und mit Äther extrahiert. Die Ätherphase wurde nach Trocknen über Na_2SO_4 und Einengen im Hochvakuum destilliert. Bei $110-116^\circ/0,1-0,2$ Torr ging 16 über. Ausbeute: 158 g (76%). $n_D^{20}=1.4330$.

5.3.2. 2-(1-Hydroxyäthyl)-3-methylbernsteinsäure-diäthylester (26)

16 g (0,43 Mol) Natriumborhydrid wurden in einer Mischung aus 600 ml Dioxan und 60 ml Wasser gelöst. Dazu wurden langsam bei RT 79 g (0,34 Mol) 16 in 450 ml Dioxan getropft. Anschließend wurde drei Stunden bei RT gerührt, wobei sich ein weißer Niederschlag bildete. Nach Abdekantieren und Zugabe von 500 ml Wasser wurde mit Chloroform dreimal extrahiert und der farblose, klare Extrakt getrocknet und eingeeengt. Ausbeute: 62 g (79%) als Öl. In der GC konnten vier Peaks für 26 nachgewiesen werden.

5.3.3. 2-(1-Hydroxyäthyl)-3-methylsuccinimid (27)

58 g (0,25 Mol) 26 wurden mit 500 ml 25 proz. Ammoniak versetzt und so lange bei RT gerührt, bis eine klare Lösung entstanden war (36 Stunden). Nach Einengen und Zugabe von etwas Wasser wurde der Rückstand im Perforator mit Äthylacetat kontinuierlich extrahiert. Ausbeute: 37 g (92%) als Öl. In der GC konnten für das Öl mit Stickstoff-Detektor (N-FID) zwei stickstoffhaltige Substanzen sowie zwei weitere Substanzen ohne Stickstoff nachgewiesen werden. DC (Fließmittel Id): $R_F = 0,13$.

5.3.4. 2-(1-Chloräthyl)-3-methylsuccinimid (7)

Zu einer Lösung von 20 g (0,13 Mol) 27 in 120 ml Chloroform und 13 ml Pyridin wurden unter Eiskühlung 20 ml ($\sim 30 \text{ g} \hat{=} 0,25 \text{ Mol}$) Thionylchlorid zugetropft. Das Gemisch blieb zwei bis drei Tage bei RT stehen und wurde dann eingeeengt. Die dunkelbraune Masse wurde in Chloroform aufgenommen, mit verdünnter Natriumcarbonatlösung und anschließend mit Wasser gewaschen, getrocknet und eingeeengt. Es entstanden 21 g eines Gemisches aus Öl und Kristallen. In der GC konnten ebenso wie in der DC der Verbindung 7 zwei Kom-

ponenten zugeordnet werden. Durch Vergleich mit einer Standardlösung des kristallinen Isomeren in der GC war zu ermitteln, daß 60 % der erhaltenen 21 g reines 7 darstellen. Somit beträgt die auf 27 bezogene Ausbeute an 7: 55 % d.Th..

DC (Fließmittel Id): 7a: $R_f = 0,41$; 7b: $R_f = 0,48$.

Schmelzpunkt (7a): 147-148°.

Die Daten des $^1\text{H-NMR}$ -Spektrums von 7a sind in Tabelle 1, S. 21 aufgeführt. Die übrigen Daten zeigt Tabelle 9.

Tabelle 9: Daten der beiden Isomeren der Chlor-Verbindung 7;

7a: C,H,N-Analyse, IR, MS im Direkteinlaß (s. Abb. 3, S. 21) bei 75 V und 130°/130° sowie über GC-MS-Kopplung bei 30 V und 160°/160°; 7b: MS aus GC-MS bei 30 V und 160°/160°.

Elementaranalyse			Massenspektren													
<u>7a</u>			m/e	<u>7a</u>	<u>7a</u>	<u>7b</u>	m/e	<u>7a</u>	<u>7a</u>	<u>7b</u>						
Ber.	Gef.			rel.Int.(%)				rel.Int.(%)								
				75 V	30 V	30 V		75 V	30 V	30 V						
C	47.87	47.73	175 (M ⁺)	3	2	1	52	5	-	-						
H	5.73	5.69	141	5	5	5	51	9	-	-						
N	7.97	8.01	140	55	58	58	50	5	-	-						
Cl	20.20	20.24	138	-	-	3	44	8	-	-						
			137	-	-	4	43	11	-	-						
			104	6	6	3	42	8	3	3						
			97	4	6	6	41	56	22	28						
			96	-	4	4	40	11	-	-						
			89	11	6	5	39	42	3	3						
			70	9	8	7	38	8	-	-						
			69	100	100	100	37	4	-	-						
			68	12	11	11	32	4	-	-						
			67	18	10	13	29	8	-	-						
			66	3	-	3	28	16	-	-						
			65	6	-	-	27	28	-	-						
			63	8	-	-	26	8	-	-						
			57	5	-	-	18	-	8	9						
			55	7	-	-	17	5	-	-						
			54	6	-	-	14	5	-	-						
			53	25	9	8	5	-	18	21						
IR-Spektrum (KBr)																
<u>7a</u> [cm ⁻¹]																
3190 ss	1230 w															
3070 m	1175 s															
2980 m	1130 m															
2930 w	1085 w															
2750 w	1060 w															
1765 s	1020 m															
1705 ss	985 w															
1440 w	950 m															
1370 m	915 w															
1345 s	805 s															
1280 w	720 w															
1250 w	665 w															
			Die MS-Tabelle zeigt deutlich den Einfluß der Ionisations-Spannung auf die Fragmentierung.													

Die MS-Tabelle zeigt deutlich den Einfluß der Ionisations-Spannung auf die Fragmentierung.

5.3.5. 2-Äthyliden-3-methylsuccinimid (5 bzw. 6)

Um die Stereoisomeren 5 und 6 getrennt herzustellen, wurden 2 g des zu 60% 7 enthaltenden Isomerengemisches über eine Kieselgel-Säule mit Fließmittel Id aufgetrennt. Dabei fiel die eine Fraktion von 7 im Gemisch mit 5, die andere im Gemisch mit 6 an.

Wurden die zur Trockne eingeeengten Gemische jeweils mit 2n Ammoniak in Methanol zwei Stunden stehengelassen, so lag in einer Lösung ausschließlich 5, in der anderen ausschließlich 6 vor. Nach Abziehen des Methanols und Zugabe von Wasser wurde mit Äthylacetat extrahiert. Die Extrakte wurden über Natriumsulfat getrocknet und eingeeengt; 5 konnte mit Tetrachlorkohlenstoff kristallisiert werden. Ausbeute: 545 mg 5.

DC (Fließmittel Id): 5: $R_f = 0,40$; 6: $R_f = 0,47$.

Schmelzpunkt: 95-96°.

Weitere Daten: Tabelle 10.

Tabelle 10: Daten von 2-Äthyliden-3-methylsuccinimid: IR von 5 und MS von 5 und 6 (30 V, 150°/150°, GC-MS).

IR-Spektrum (KBr)			Massenspektren						
$\underline{5}$ [cm ⁻¹]			$\underline{5}$ $\underline{6}$ m/e rel.Int. (%)			$\underline{5}$ $\underline{6}$ m/e rel.Int. (%)			
3150	s	1135	s	140	3	8	66	5	14
3040	s	1080	w	139 (M ⁺)	17	100	65	3	8
2970	w	1060	w	124	-	16	57	-	3
2930	w	1030	s	112	-	3	55	-	3
2765	m	985	w	111	-	14	54	3	5
1760	ss	935	m	110	-	16	53	40	49
1700	ss	830	s	97	6	4	44	3	5
1660	ss	760	m	96	82	66	43	3	8
1430	m	720	m	95	3	5	42	8	9
1370	m	695	w	94	-	3	41	16	22
1335	s	650	w	82	-	8	40	12	14
1250	s	610	w	81	3	14	39	5	9
1190	s			78	-	4	32	-	5
				69	5	7	28	3	8
				68	96	94	27	6	7
				67	100	96	18	13	23

5.3.6. 2-[1-(Äthylthio)äthyl]-3-methylsuccinimid (8)

200 mg (1,4 mMol) 7 wurden in 20 ml Methanol und 1 ml 25 proz.

Ammoniak gelöst. Dazu wurden 30 Tropfen (~ 300 mg $\hat{=}$ 5 mMol) Äthan-

thiol gegeben. Nach drei-stündigem Stehenlassen bei RT wurde eingengt, nach Wasserzugabe mit Äthylacetat extrahiert und der Extrakt in präparativer DC an Kieselgel mit Fließmittel Id gereinigt. Ausbeute: 140 mg (60%) an 8.

Mit Fließmittel Ib und Ic war bei Mehrfachentwicklung die Auftrennung in offenbar zwei Bestandteile (Doppelfleck) zu sehen (s. Abb. 6, S. 29). Auch in der GC gab es Hinweise auf möglicherweise zwei Komponenten von 8.

DC (Fließmittel Ib): $R_f = 0,38 - 0,41$ (Doppelfleck, Zweifachentwicklung).

Weitere Daten s. Lit. 96 und Lit. 97.

5.3.7. S-[1-(4-Methyl-2,5-dioxo-3-pyrrolidiny)äthyl]cystein (9)

25 mg (0,15 mMol) 7 wurden in 20 ml Methanol und 1 ml 25 proz. Ammoniak gelöst. Dazu wurde eine Lösung von 19 mg (0,15 mMol) Cystein in 2 ml Wasser gegeben. Nach zwei Stunden wurde nach Wasserzugabe zweimal mit Äthylacetat extrahiert, um überschüssiges 5/6 zu entfernen. Nach Abziehen i. Vak. wurde die wäßrige Phase lyophilisiert. Das Lyophilisat wog 40 mg ($\hat{=}$ 90% Ausbeute), enthielt jedoch laut DC sowohl etwas Cystein/Cystin als auch 5/6.

Das Hauptprodukt 9 zeigte einen R_f -Wert von 0,7-0,8 (Doppelfleck) in Fließmittel VIc (Anfärbung mit Ninhydrin und Chlor/Benzidin).

5.3.8. 2-[1-(Äthylsulfonyl)äthyl]-3-methylsuccinimid (20)

175 mg (1 mMol) 7 wurden in 50 ml Methanol und 3 ml 25 proz. Ammoniak gelöst. Dazu wurden 30 Tropfen ($\hat{=}$ 300 mg $\sim$ 5 mMol) Äthanthiol gegeben. Nach drei-stündigem Stehenlassen bei RT wurde ganz eingengt und 100 ml (10 mMol) Chromsäure (1% $\text{CrO}_3/2n \text{H}_2\text{SO}_4$) dazu gegeben. Nach einer Stunde bei RT wurde schnell zehnmal mit Äthylacetat extrahiert (keine kontinuierliche Extraktion wegen Essigsäurebildung!) und der Extrakt nach Trocknen über Natriumsulfat zur Trockne eingengt. Die farblose Masse wurde in Wasser aufgenommen und gefriergetrocknet. Ausbeute: 225 mg (97%).

Die so erhaltene Verbindung 20 lag ausschließlich in zwei chromatographisch trennbaren, mengengleichen Komponenten vor:

DC (Fließmittel Id): $R_f = 0,10$ und $0,18$.

Die beiden Imidfraktionen wurden an einer Kieselgelsäule präparativ aufgetrennt (Fließmittel Id). Aus dem eingengten Eluat

Tabelle 11: Daten der Sulfon-Isomeren 20a und 20b (s. Abb. 7 - 9).

Massenspektren (75 V, 140°/180°)			IR-Spektren (KBr)		¹ H-NMR-Spektren			
m/e	<u>20a</u>	<u>20b</u>	<u>20a</u>	<u>20b</u>	<u>20b</u>			
	rel.Int. (%)		[cm ⁻¹]		CDCl ₃	CDCl ₃ 2 MeOD 1	DMSO	
					δ (ppm)			
233 (M ⁺)	1	1	3250 ss	3250 s	2'-CH ₃	1.36	1.37	1.23
141	4	5	3090 w	3090 w	2'-H	3.74	3.79	3.75
140	78	20	2985 m	2985 m	2-H	3.36	3.31	(3.25)
139	23	7	2940 m	2940 m	3-H	3.04	2.99	2.83
126	4	2	2880 w	2880 w	3-CH ₃	1.50	1.46	1.29
122	4	2	2730 w	2740 w	α-CH ₂	3.07	3.13	3.21
97	13	10	2320 w	2320 w	β-CH ₃	1.45	1.45	1.22
96	31	8	1780 s	1770 s	N-H	8.0	8.42	7.82
94	16	3	1760 m	1710 ss				
77	9	2	1450 m		J (Hz)			
70	8	7	1440 m	1440 m	J _{2''2'}	7.1	6.8	7.0
69	100	100		1370 m	J _{2'2}	2.8	2.6	(2.5)
68	40	12	1345 s	1340 s	J ₂₃	5.7	5.3	5.5
67	45	13	1315 s	1315 w	J _{3'3}	7.0	7.0	7.0
66	15	5	1280 s	1285 s	J _{αβ}	7.5	7.2	7.5
65	5	2	1255 s	1270 m				
54	7	2	1230 w	1240 m	<u>20a</u>			
53	38	11		1200 m	CDCl ₃		DMSO	
52	6	2	1160 s	1175 s	δ (ppm)			
51	8	2	1110 s	1110 s	2'-CH ₃	1.55	1.42	
50	4	2	1080 m	1090 w	2'-H	3.85	3.86	
48	8	2	1025 m	1025 w	2-H	2.74	2.99	
44	6	2	995 m	1000 m	3-H	3.33	2.97	
43	4	10	945 m	940 m	3-CH ₃	1.44	1.27	
42	7	3	910 m	910 w	α-CH ₂	3.07	3.14	
41	78	31		850 w	β-CH ₃	1.40	1.21	
40	19	4	815 w	815 w	N-H	8.16	8.2	
39	35	14	770 s	770 s	J (Hz)			
38	5	2		750 m	J _{2''2'}	7.3	6.8	
32	8	2	720 s	720 m	J _{2'2}	3.0	2.5	
29	41	12		680 w	J ₂₃	6.5	(5.5)	
28	61	12	650 m	650 w	J _{3'3}	7.0	6.5	
27	44	13	615 w	615 w	J _{αβ}	7.3	7.5	
26	11	3	580 m	580 m				
18	4	5						
15	5	2						
14	4	2						
Elementaranalyse								
	Ber.	Gef. <u>20a</u>	Gef. <u>20b</u>					
C	46.34	46.03	46.37					
H	6.48	6.59	6.22					
N	6.00	5.99	5.93					

der Fraktion mit $R_f = 0,18$ kristallisierte nach einem Tag die Verbindung mit $R_f = 0,18$ aus (20b). Aus dem Eluat der Fraktion mit $R_f = 0,10$ ließ sich zunächst nichts auskristallisieren. Es wurde zu einem Öl eingeeengt. Das Öl wurde in einem kleinen Volumen eines Gemisches aus Äthylacetat und Tetrachlorkohlenstoff (1:1) aufgenommen und Tetrachlorkohlenstoff dazugegeben, bis es einen etwa dreifachen Überschuß hatte. Dann wurde die Lösung in ein Gefrierfach bei -20° gestellt. Dort fiel nach zwei Tagen ein kristalliner Niederschlag aus, der in der DC wieder einheitlich bei $R_f = 0,10$ erschien (20a).

Schmelzpunkte: 20a: 114° ; 20b: 166° .

Alle weiteren Daten von 20a und 20b sind in Tabelle 11 zusammengefaßt.

5.3.9. 2- [1-(4-Methyl-2,5-dioxo-3-pyrrolidiny)äthylsulfonyl] alanin(29)

Die Verbindung 29 wurde nur dünnschichtchromatographisch nachgewiesen. 20 mg (0,07 mMol) 9 wurden in 50 ml (5 mMol) Chromsäure ($1\% \text{CrO}_3/2n \text{H}_2\text{SO}_4$) gelöst und eine Stunde bei RT stehen gelassen. Aus der wäßrigen Lösung wurde direkt auf die DC-Platte aufgetragen. R_f (Fließmittel VIc): 0,5-0,6 (länglicher Fleck), Anfärbung mit Ninhydrin und Chlor/Benzidin.

5.3.10. S- [1-(4-Methyl-2,5-dioxo-3-pyrrolidiny)äthyl]cystein-methylester (32) und S- [1-(4-Methyl-2,5-dioxo-3-pyrrolidiny)äthyl]-N-acetyl-cystein-methylester (33)

Die Verbindungen 32 und 33 wurden nur dünnschichtchromatographisch nachgewiesen. 100 mg (0,8 mMol) Cystein bzw. N-Acetyl-cystein wurden unter Kühlung in 20 ml methanolischer Salzsäure gelöst und eine Stunde in der Kälte (4°) gerührt. Dann wurde im Vakuum eingeeengt, Methanol dazugegeben und dieser Vorgang zweimal wiederholt, so daß die Lösung nahezu neutral war. Die Ester hatten einen deutlich höheren R_f -Wert als die freien Säuren und waren mit Ninhydrin nachzuweisen (N-Acetyl-cystein-methylester: blaßrosa mit $R_f = 0,4$ in Fließmittel IIa).

Zu den methanolischen Lösungen wurden je 5 mg (0,04 mMol) 5/6 in Methanol sowie soviel konzentrierter Ammoniak dazugegeben, daß die Lösungen 2n an Ammoniak waren. Die nach einer Stunde gebildeten Addukte wurden in der DC identifiziert.

22: R_f (Fließmittel III) = 0,4-0,5;

22: R_f (Fließmittel IIa) = 0,15. Anfärbung jeweils mit Ninhydrin und Chlor/Benzidin.

5.3.11. 2-(1-Aminoäthyliden)-3-methylsuccinimid (17) (97)

10 ml (0,04 Mol) 25 wurden zwei Stunden mit 50 ml 25 proz. Ammoniak erhitzt, so daß eine klare Phase entstand. Beim Erkalten fiel ein farbloser, kristalliner Niederschlag aus. Dieser wurde aus Wasser umkristallisiert. Ausbeute: 1,7 g (20%) reines 17.

Schmelzpunkt: 217°.

DC (Fließmittel Id): R_f = 0,14. MS-Daten s. Tabelle 12. Weitere Daten s. Literatur 97.

Tabelle 12: Massenspektrum von 2-(1-Aminoäthyliden)-3-methylsuccinimid (17); 75 V, 125°/250°.

m/e	rel.Int. (%)	m/e	rel.Int. (%)	m/e	rel.Int. (%)	m/e	rel.Int. (%)
155	10	81	13	55	4	38	22
154(M ⁺)	64	80	9	54	8	37	11
141	3	70	4	53	8	36	5
140	16	69	16	52	13	32	20
139	100	68	68	51	13	30	9
124	6	67	16	50	9	29	9
110	7	66	19	49	5	28	64
94	4	65	7	43	13	27	13
85	4	64	3	42	20	18	7
84	8	63	5	41	37	16	6
83	4	57	6	40	23	15	10
82	22	56	3	39	11	14	7

(Fragmentierungsschema s. Lit. 94)

5.3.12. 2-Acetyl-3-methylsuccinimid (18) (97)

1 g (6,5 mMol) 17 wurden mit 100 ml 10 proz. methanolischer HCl bei RT 12 Stunden gerührt, dann eingeeengt und die zurückgebliebene Masse aus Chloroform auskristallisiert. Ausbeute: 850 mg 18 (84%). Schmelzpunkt: 78°.

DC (Fließmittel Id): R_f = 0,35. Weitere Daten s. Literatur 97.

5.3.13. 2-[1-(Äthylthio)äthyliden]-3-methylsuccinimid (19) (97)

250 mg (1,8 mMol) 17 wurden in 25 ml 10 proz. methanolischer HCl

und 2 ml (0,03 Mol) Äthanthiol vier Stunden zum Sieden erhitzt und dann eingeeengt. Der ausgefallene Niederschlag wurde abgesaugt, in Methanol/2n Ammoniak aufgenommen und eine Stunde erhitzt. Nach Erkalten und Einengen erhielt man farblose Nadeln. Ausbeute: 150 mg 19 (80%). Schmelzpunkt: 150°.

DC (Fließmittel Id): $R_f = 0,60$. MS-Daten s. Tabelle 13. Weitere Daten s. Literatur 97.

Tabelle 13: Massenspektrum von 2-[1-(Äthylthio)äthyliden]-3-methylsuccinimid (19); 30 V, 160°/160° (GC-MS).

m/e	rel.Int. (%)	m/e	rel.Int. (%)	m/e	rel.Int. (%)	m/e	rel.Int. (%)
201	8	143	5	110	11	68	22
200	16	142	13	100	15	67	57
199(M ⁺)	90	141	9	99	25	66	10
186	5	140	13	98	6	65	16
184	11	139	20	97	8	61	7
183	5	138	34	96	24	60	6
182	30	137	8	95	36	59	22
171	11	128	15	94	9	57	9
170	22	127	25	93	6	55	7
167	8	126	10	88	17	44	6
166	29	125	6	85	22	43	13
165	6	124	12	84	12	41	15
156	15	123	8	83	6	29	8
155	23	115	5	82	5	28	10
154	100	114	7	81	5	27	5
153	5	113	55	79	7	18	23
150	5	112	10	71	8	17	5
149	9	111	8	69	10	5	39

(Fragmentierungsschema s. Lit. 94)

5.4. Reaktionen von Succinimiden

5.4.1. Eliminierungsversuche mit quantitativer Bestimmung

a) Eliminierung von 9 und 29

Zur Untersuchung des Eliminierungsverhaltens von 9 und 29 bei vier verschiedenen Behandlungsmethoden wurden 10 äquivalente Mengen 7 eingesetzt: 400 mg (1,4 mMol) des bei Synthese von 7 erhaltenen Isomerengemisches wurden in 200 ml Methanol gelöst, 10 ml 25 proz. Ammoniak dazugegeben und bei RT eine Stunde gerührt. Dann wurde in 10 äquivalente Mengen à 21 ml aufgeteilt und zu neun der zehn Proben

2 ml einer Lösung von 500 mg (4,2 mMol) Cystein in 18 ml Wasser gegeben. Der große Überschuß des Thiols war wegen dessen Luftoxidation und aufgrund der Tatsache, daß nur das bei Eliminierung freiwerdende Imid gemessen wurde, sinnvoll. Die zehnte Probe ohne Cystein-Zugabe diente als Standard für die eingesetzte Menge an 5/6.

Die Additionslösungen standen zwei Stunden verschlossen bei RT. Alle zehn Proben wurden im Vakuum zur Trockne einrotiert, was vier Stunden in Anspruch nahm; (da die zuletzt einrotierte Lösung als Blindprobe für 9 diente und bei ihr kein Eliminierungsprodukt nachzuweisen war, schied die Fehlermöglichkeit einer reversiblen Freisetzung des eingesetzten 5/6 aus).

Von den neun gleichen Proben des Thioäthers 9 wurden vier eine Stunde a) mit Chromsäure bei RT,

b) mit Chromsäure bei 100° (Trockenschrank auf 150°)

c) mit Ammoniak bei RT

d) mit Ammoniak bei 100°

behandelt (Volumen jeweils 25 ml), weitere vier Proben wurden erst eine Stunde mit je 20 ml Chromsäure bei RT behandelt, danach mit Äthylacetat extrahiert und dann ebenfalls den vier angegebenen Behandlungsmethoden unterzogen (bei NH₃, RT Zugabe von konz. NH₃ unter Eiskühlung). Alle acht Proben wurden je dreimal mit 5 ml Äthylacetat extrahiert (die Ammoniak-Proben erst nach vorherigem Ansäuern) und die Extrakte alle nach Waschen und Trocknen über Natriumsulfat in Meßkolben auf 20 ml Äthylacetatlösung aufgefüllt. Eine Probe wurde nach dem Einrotieren direkt mit 20 ml Äthylacetat extrahiert (Blindprobe).

Von jeder der zehn Lösungen wurden 2 µl in die GC-Säule eingespritzt. Die Aufzeichnung der Peaks erfolgte in mehreren Versuchsreihen mit unterschiedlicher Verstärkung des FID-Signals sowie unterschiedlicher Schreibergeschwindigkeit. Die quantitative Auswertung der Chromatogramme erfolgte nach der Peakhöhen-Methode (Eliminierung von 29 mit Ammoniak bei RT s. Abb. 15, S. 65).

b) Eliminierung von 8 und 20

Die Versuche wurden analog zu den unter (a) beschriebenen durchgeführt; statt Cystein wurde Äthanthiol eingesetzt.

Das bei der Eliminierung von 20a entstehende 5 wurde in präparativer DC isoliert und durch MS charakterisiert (Tabelle 14).

Tabelle 14: Massenspektrum von E-2-Äthyliden-3-methylsuccinimid, das bei Eliminierung des Sulfons 20a mit 2n wäßrigem Ammoniak entsteht; 30 V, 110°/125°.

m/e	rel.Int. (%)	m/e	rel.Int. (%)
140	5	66	4
139	18	55	3
97	9	53	31
96	53	43	6
69	15	42	9
68	100	41	9
67	77		

5.4.2. Untersuchung der Thioladdition (→8), Chromsäureoxidation (→20) und Eliminierung (→5/6) mit nach E-(5) und Z-(6)-Konfiguration getrenntem Ausgangsmaterial

Das bei der Synthese von 7 erhaltene Isomerengemisch wurde über eine Kieselgelsäule (Fließmittel Id) aufgetrennt. Die Fraktionen mit 5/7a und mit 6/7b wurden eingeengt und durch Ammoniak/Methanol quantitativ in 5 bzw. 6 übergeführt. Dann wurden beide Isomeren zuerst mit Äthanthiol im Überschuß versetzt, nach zwei Stunden (DC-Kontrolle) eingeengt und mit Chromsäure im Überschuß versetzt. Die Chromsäurelösungen standen über Nacht bei RT, wurden am nächsten Tag mit Äthylacetat sechsmal extrahiert und die Extrakte gewaschen, getrocknet und eingeengt. Ein kleiner Teil der erhaltenen Substanzen 20a und 20b wurde direkt der Eliminierung mit Ammoniak unterworfen. Der größte Teil von 20a und 20b wurde, wieder nach Ausgangsmaterial getrennt, über Kieselgel-Säulen aufgetrennt, wobei das Sulfon des Ausgangsproduktes 5 mengengleich als 20a und 20b anfiel, das Ausgangsprodukt 6 etwa viermal soviel 20b wie 20a lieferte. Die vier erhaltenen Isomeren wurden mit MS- und NMR-Spektroskopie untersucht, außerdem wurden Mischschmelzpunkte von 20b aus 5 und 20b aus 6 gemacht (166°).

5.4.3. Oxidation des Thioäthers 8 mit CrO₃ in D₂SO₄

1 g (3,5 mMol) des Isomerengemisches von 7 wurden in 220 ml Methanol und 22 ml 25 proz. Ammoniak gelöst, dazu 6 ml (≈75 mMol) Äthanthiol gegeben. Nach einem Tag bei RT und DC-Kontrolle wurde die Lösung im Vakuum bei RT zur absoluten Trockne eingeengt. Dann wurde

in 105 ml (100 ml D_2O + 5 ml konz. D_2SO_4) einer 1 proz. deuterierten Chromsäurelösung aufgenommen, am nächsten Tag nach DC-Kontrolle fünfmal mit Äthylacetat extrahiert, der Extrakt getrocknet, über Aktivkohle gereinigt und auf 2 ml eingeeengt.

Diese konzentrierte Sulfonlösung wurde über eine Kieselgel-Säule in die Isomeren 20a und 20b aufgetrennt. Von den dabei kristallin gewonnenen 20a und 20b wurden NMR-Spektren und Schmelzpunkte gemacht (Daten wie in Kap. 5.3.8.).

5.4.4. Oxidation von 8 mit Kaliumpermanganat und Wasserstoffperoxid

a) Kaliumpermanganat

50 mg (0,25 mMol) 8 wurden in 50 ml einer Mischung aus Eisessig und Wasser (1:1) aufgenommen, dazu 0,5 g (3 mMol) $KMnO_4$ gegeben und eine Stunde bei RT gerührt (Lösung 1% Permanganat; vgl. Lit. 27 : 3%). Dann wurde die Lösung direkt auf eine DC-Platte aufgetragen. R_f (Fließmittel Id) = 0,10 und 0,18; 20a und 20b mengengleich, 8 verschwunden.

b) Wasserstoffperoxid

50 mg (0,25 mMol) 8 wurden in 50 ml 2n Essigsäure aufgenommen und 0,4 ml Perhydrol (= 120 mg H_2O_2 = 3,5 mMol H_2O_2 = stöchiometrisch doppelter Überschuß gegenüber 8) dazugegeben. Die Lösung wurde eine Stunde bei RT gerührt und dann direkt auf eine DC-Platte aufgetragen. Es waren wieder mengengleich 20a und 20b entstanden: R_f (Fließmittel Id) = 0,10 und 0,18.

5.4.5. Versuche zur Kinetik der Eliminierung von 7 und zum Einfluß der Basenkonzentration

Die beiden Isomeren 7a und 7b wurden in gleicher Weise untersucht: Je 5 mg (0,03 mMol) 7a und 7b wurden in drei verschiedenen Mischungen (jeweils 1 ml) gelöst:

- a) Methanol : 25 proz. Ammoniak = 1 : 1 (6,8n Ammoniak)
- b) " " = 10 : 1 (1,3n Ammoniak)
- c) " " = 100 : 1 (0,13n Ammoniak)

Im Moment der Zugabe der Mischung wurde die Zeit genommen und dann nach 1,2,3,4,5,7,10,15,20,25,30,40 und 60 Minuten jeweils eine Probe der Lösung auf eine DC-Platte aufgetragen. Bei allen sechs Versuchen wurde jeweils eine konstante Kapillarenfüllung verwendet.

5.4.6. Reaktionen der Acetylverbindung 18 mit Äthanthiol

Bei der Synthese von 19 aus 18 und Äthanthiol stellte sich eine Farbreaktion ein, sobald die Lösung basisch wurde. Die im Säuren schwach gelbliche Lösung wurde eingeeengt und in Methanol aufgenommen. Wurde Ammoniak dazugegeben, färbte sich die Lösung orangefarben. Wurde die Lösung verschlossen (mit Schliffstopfen) zwei Stunden stehengelassen, so entfärbte sie sich wieder bis schwach gelblich. Wurde der Schliffstopfen geöffnet, so bildeten sich an der Oberfläche orangefarbene Schlieren, durch Schütteln wurde die Lösung ganz gefärbt.

Wurde Äthanthiol dazugegeben, so wurde die Farbe intensiv rot. Beim Entfärben durch Stehenlassen bildete sich dann ein grüner Niederschlag, der sich beim erneuten Schütteln unter Luftzutritt wieder auflöste. War die Lösung entfärbt und wurde geschüttelt, ohne daß der Stopfen geöffnet wurde, so trat keine Färbung auf.

5.5. Isolierung von Biliproteiden

5.5.1. Algenzucht*)

Es wurden die Blaualgen *Anacystis nidulans* und *Pseudanabaena* sp. gezüchtet. Als Nährmedium wurde das von R. WAGENMANN (pers. Mitteilung) modifizierte Blaualgen-Medium (58) eingesetzt. Vier ERLENMEYER-Kolben wurden wie folgt gefüllt und autoklaviert (für 1 l):

Kolben I (950 ml aqua dest.):	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,25 g
	$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0,025 g
	KNO_3	1,0 g
Kolben II (15 ml aqua dest.):	K_2HPO_4	1,0 g
Kolben III (15 ml aqua dest.):	Spurenelementlösung	1 ml
Kolben IV (20 ml aqua dest.):	Fe-AEDTA-Puffer pH=7,6	1 ml

Nach Vereinigen der Lösungen wurden Flüssigkeitskulturen in 200 ml-ERLENMEYER-Kolben angesetzt: Mit einer Agar-Kultur von *Anacystis nidulans* (Univ. Göttingen) bzw. der von R. WAGENMANN und W. RÜDIGER gereinigten neuen Alge *Pseudanabaena* sp. wurden Mengen von 50-100 ml Nährmedium angeimpft. Die auf einer Schüttelmaschine mit Weißlicht bestrahlten Kulturen konnten nach zwei Wochen auf größere Flaschen gegeben werden (Verdünnung dabei 1:12).

*) Eine genauere Beschreibung der verwendeten Apparate findet sich in Lit. 53

Die Algenzuchtflaschen mit 8 cm ϕ x 80 cm wurden über ein Gaseinleitungsrohr mit einem Luft/CO₂-Gemisch durchspült und dabei von außen mit Weißlicht bestrahlt. In diesen Flaschen schienen die Algenkulturen jeweils am besten zu gedeihen.

Nach weiteren 10-14 Tagen wurden zwei Flaschen à je 3 l auf eine Tonne mit 12 l Nährmedium gegeben. Auch in den Tonnen wurde Luft/CO₂ durchgeleitet, die Leuchtröhren saßen dabei im Medium. Nach 14 Tagen wurde das Gesamtvolumen von 18 auf 33 l erweitert, nach weiteren 10 Tagen auf 50 l. Erneut 10 Tage später wurde der Inhalt der Tonnen im Durchflußrotor abzentrifugiert.

Ausbeute: 40 g Algen (bei *Anacystis nidulans*, Naßgewicht).

5.5.2. Isolierung von C-Phycoerythrin und C-Phycocyanin aus *Pseudanabaena* sp.

Die Isolierung von C-Phycoerythrin und C-Phycocyanin erfolgte aus *Pseudanabaena* sp.

Der Algenniederschlag wurde in einer Zelmühle durch hochfrequente Erschütterung mit Glasperlen aufgeschlossen und der Zellinhalt in 0,02 M Tris-Puffer vom pH=7,8, der auch in den folgenden Arbeitsschritten verwendet wurde, aufgenommen. Die Suspension wurde bei 20 000 g vorzentrifugiert, um die Hauptmenge des Chlorophyll-haltigen Zellwandmaterials von den gelösten Substanzen zu trennen. Es folgte eine Ultrazentrifugation bei 60 000 g zur Entfernung letzter, nicht gelöster Partikel. Der Überstand wurde als Rohextrakt bezeichnet.

Dieser wurde durch 75 proz. AS-Fällung konzentriert und nach Dialyse einer Gelfiltration an Sephadex-G-100 unterzogen. Dabei trennte sich die Hauptmenge von eingipfligem C-Phycoerythrin von den restlichen Biliproteid-Fractionen ab, welche neben C-Phycocyanin noch weitere Fractionen von offenbar kürzerkettigem C-Phycoerythrin sowie Allo-Phycocyanin enthielten. Die mit dieser Gelfiltration erfolgte Reinigung von eingipfligem C-Phycoerythrin reichte aus, um damit die Abbauten durchzuführen.

Das Eluat des Biliproteidgemisches wurde fraktioniert mit AS gefällt. Dabei fiel die Hauptmenge des C-Phycocyanins mit einem Rest von eingipfligem C-Phycoerythrin bei 50 proz. Sättigung aus. Die überwiegende Menge des Erythrins und ein Rest von Cyanin blieb im Überstand (Die AS-Fällungen wurden bei 40 000 g abzentrifugiert).

Dieser Überstand wurde durch weitere Zugabe von AS auf 60 proz. Sättigung gebracht. Dabei fiel ausschließlich zweigipfliges C-Phycoerythrin aus. Nach dessen erneuter Abtrennung wurde die AS-Konzen-

tration auf 70 proz. Sättigung erhöht. Wieder fiel in größeren Mengen zweigipfliges C-Phycoerythrin und ein Rest von offenbar proteolysiertem C-Phycocyanin aus.

Zur Isolierung von C-Phycocyanin wurde die AS-Fällung bei 50 proz. Sättigung dialysiert und auf eine Sephadex-G-200 Säule aufgetragen. Bei dieser Gelfiltration gelang eine saubere Abtrennung des C-Phycocyanins. Die Fraktionen des Eluats der G-200-Säule wurden so geschnitten, daß die spektralen Eigenschaften der ersten und letzten Fraktion des Cyanins übereinstimmten. Diese sauberen Fraktionen wurden wieder durch AS-Fällung (60%) konzentriert und der AS-Niederschlag dialysiert. Das Dialysat wurde gefriergetrocknet.

Ausbeute: 0,1% C-Phycocyanin, bezogen auf das Algenfrischgewicht.

Das bei Gelfiltration des Rohextraktes an G-100 anfallende Eluat mit eingipfligem C-Phycoerythrin wurde durch 50 proz. AS-Fällung konzentriert und lyophilisiert. Dabei sind zwar noch farblose Fremdproteine im Lyophilisat, aber keine bei den Abbauten störenden fremden Biliproteide (s. Abb. 18, S.80).

Zu etwa dem gleichen Reinheitsgrad führte eine Abtrennung des C-Phycoerythrins aus dem Rohextrakt durch Ionenaustauscherchromatographie an DEAE-Cellulose. Das eingipflige C-Phycoerythrin wurde dabei zuerst eluiert. Es schloß sich wieder die AS-Fällung, Dialyse und Gefriertrocknung an.

Ausbeute: 0,5% C-Phycoerythrin, bezogen auf das Algenfrischgewicht.

5.5.3. Isolierung von Phytochrom

a) Arbeitsbedingungen

Sämtliche Arbeiten mit Phytochrom wurden unter grünem Sicherheitslicht durchgeführt, um eine bei Weißlicht mögliche Umwandlung in die P_{FR} -Form, die wesentlich instabiler als die P_R -Form ist (69), zu vermeiden. Die Lösungen und Säulen wurden stets kühl gehalten (im Kühlraum ca. 4°). Der pH-Bereich von 6-8 wurde nicht verlassen, da nur dort das Phytochrom stabil ist (59).

Die Bestimmung der Phytochrom-Konzentration über die $\Delta(\Delta E)$ -Werte erfolgte mit dem DMR 22. Zur Bestrahlung bei 660 nm und 730 nm wurde Weißlicht durch entsprechende Filter geschickt: Rotes Plexiglas (2 mm, Nr.501 der Fa. RÖHM & HAAS, Darmstadt) für Hellrot und dreiteiliges Plexiglas blau-rot-blau (Nr.627 blau, Nr.501 rot) für Dunkelrot. Zur genauen Beschreibung der Belichtungseinrichtung s. Literatur 44.

b) Reihenfolge der Arbeitsschritte

Folgender Puffer wurde verwendet: 0,01 m Tris, 0,01 m EDTA, 0,001 m NaN_3 (pH=7,8). Das Eluat der Sephadex-G-50-Säule (s. Kap. 4.4.1.) wurde durch AS-Fällung mit 50 proz. Sättigung konzentriert (ASF 1). Das Dialysat von ASF 1 wurde auf eine Sephadex-G-200-Säule aufgetragen. Das Elutionsdiagramm der G-200-Säule ist in Abbildung 23 wiedergegeben. Die Fraktionen mit geringeren $\Delta(\Delta E)$ -Werten wurden nicht berücksichtigt (in Abb. 23: < 105 und > 140).

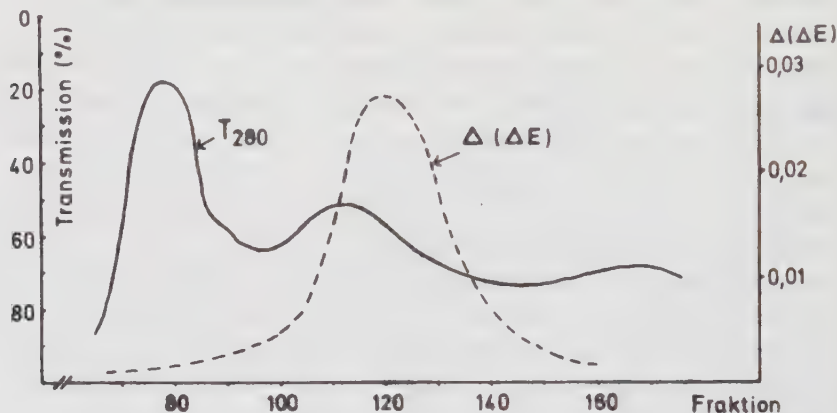


Abb. 23: Elutionsdiagramm der Gelfiltration von Phytochrom an Sephadex-G-200; 0,01m Tris-Puffer pH=7,8; Durchflußgeschwindigkeit: 30 ml/h; 7 ml Eluat pro Fraktion;
 T_{280} = Transmission des Eluats bei 280 nm.

Aus Abbildung 23 geht hervor, daß die Reinigung an G-200 vor allem hochmolekulare Bestandteile (Nukleinsäuren und Proteine) äbtrennt. Die P-haltigen Fraktionen wurden durch AS-Fällung mit 50 proz. Sättigung konzentriert (ASF 2). Das Dialysat von ASF 2 wurde auf eine DEAE-Sephadex-Säule aufgetragen. Deren Elutionsdiagramm zeigt Abbildung 24. Auch hier wurden nur die stärker P-haltigen Fraktionen weiterverarbeitet (in Abb. 24 Fraktion 82 - 105).

Die AS-Fällung (50 proz. Sättigung) dieser Fraktionen (ASF 3) wurde erneut dialysiert. Dieses Dialysat gelangte zur Gefriertrocknung.

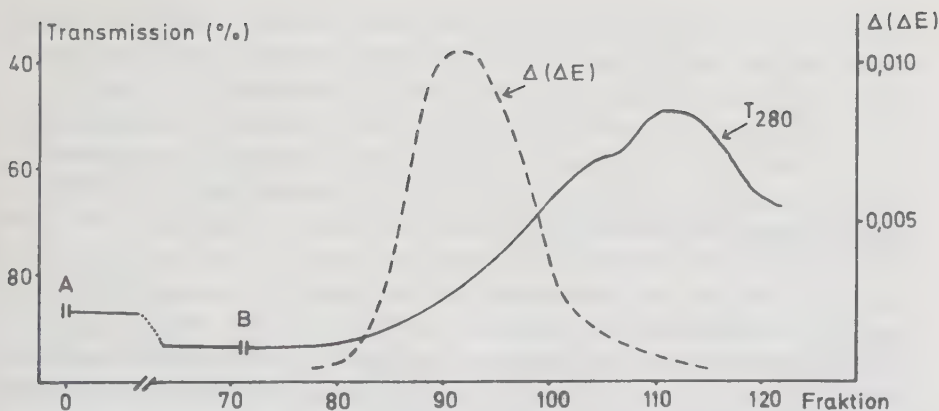


Abb. 24: Elutionsdiagramm der Ionenaustauscher-Chromatographie von Phytochrom an DEAE-Sephadex-A-50; 7 ml Eluat pro Fraktion; T₂₈₀ s. Abb. 23;
A: Ende des Auftrags
B: Beginn der Gradientenelution

Da nach jedem Arbeitsschritt $\Delta(\Delta E)$ aller Lösungen gemessen wurde, konnten folgende Ausbeuteverluste festgestellt werden:
Auf der G-200-Säule 20-30%, auf der DEAE-Sephadex-Säule wieder 20-30% sowie bei jeder AS-Fällung und anschließender Dialyse (dort vor allem) bis zu 20%. Dagegen war bei Gefriertrocknung keine Einbuße an photoreversiblen Material zu beobachten.

5.6. Chromsäure- und CrO_3/NH_3 -Abbauten von Biliproteiden und -peptiden

Chromsäure: Alle Abbauversuche wurden mit einer 1 proz. Lösung von CrO_3 in 2n H_2SO_4 durchgeführt.

5.6.1. Abbau von C-Phycoerythrin und C-Phycocyanin

10 mg gereinigtes Biliprotein (= mindestens 0,2 μMol) wurden in 0,7 ml Phosphatpuffer (pH=7) aufgenommen. Diese konzentrierte Lösung war nach Rühren homogen ohne ungelöste Partikel. Dann wurden drei Proben zu je 0,2 ml entnommen. Die erste Probe wurde mit 0,8 ml Chromsäure versetzt und eine Stunde im Trockenschrank auf 100° erhitzt. Die beiden anderen Proben wurden jeweils ebenfalls mit 0,8 ml

Chromsäure gut durchgemischt und eine Stunde bei RT belassen (gelegentlich gerührt). Nach einer Stunde war die Probe bei 100° eine klare gelbgrüne Lösung (a), in den beiden Proben bei RT lag die gelborange Farbe der Chromsäure unverändert vor und ein Proteinniederschlag war ausgeflockt. Dieser wurde jeweils in der Tischzentrifuge sedimentiert und der Überstand abdekantiert (b). Die Proteinniederschläge wurden zweimal mit Wasser ausgewaschen und getrennt weiterverarbeitet.

Ein Teil wurde mit 1 ml Chromsäure (oder 2n H_2SO_4) eine Stunde auf 100° erhitzt (danach Lösung c).

Der andere Teil wurde in 0,6 ml 2n Ammoniak aufgenommen; dabei bildete sich eine gelartige Lösung des Proteins, die eine Stunde bei RT gehalten und von Zeit zu Zeit umgerührt wurde. Danach wurde die Probe in Eis gekühlt und mit 0,4 ml 4n H_2SO_4 wieder angesäuert. Der wieder ausfallende Proteinniederschlag wurde abzentrifugiert (Überstand = Lösung d).

Die Lösungen a-d wurden je dreimal mit je 0,2 ml Äthylacetat extrahiert, wobei nach Schütteln die überstehende Esterphase mit einer zu einer feinen Spitze ausgezogenen PASTEUR-Pipette jeweils quantitativ abgehebert wurde. Die vereinigten Extrakte wurden mit Wasser gewaschen, dann durch Abblasen mit Stickstoff zur Trockne eingengt und in je 0,1 ml Äthylacetat aufgenommen. Dieses Volumen von 0,1 ml entsprach 10 markierten Füllungen von selbstgezogenen Kapillaren. Sodann wurden von jeder der vier Lösungen je acht Kapillar-Füllungen, und von Lösung c und d je zwei Füllungen auf die DC-Platte aufgetragen. Bei Wiederholungen der gleichen Versuche wurden auch andere Verhältnisse gewählt.

5.6.2. Abbau des Pentapeptids von C-Phycoerythrin

Zu einer Lösung von 0,5-0,6 mg Peptid ($\approx 0,5 \mu\text{Mol}$) in 1 ml Phosphatpuffer (pH=7) wurden 4 ml Chromsäure gegeben. Die Lösung nahm nach kurzer Zeit die Farbe von reiner Chromsäure an und wurde in zwei gleiche Hälften geteilt, wovon die eine für eine Stunde in den Trockenschrank bei 100° gestellt (a), die andere eine Stunde bei RT gehalten wurde (b).

Beide Lösungen wurden danach je dreimal mit je 0,5 ml Äthylacetat extrahiert. Lösung b wurde dann unter Eiskühlung langsam mit konzentriertem Ammoniak versetzt, bis pH=10 erreicht war; nach einer Stunde bei RT wurde sie wieder mit 4n H_2SO_4 vorsichtig (gekühlt) auf pH=0-1 gebracht (Lösung c) und dreimal mit je 0,5 ml Äthylacetat

extrahiert. Die durch Abblasen mit Stickstoff eingeeengten Extrakte der Lösungen a-c wurden quantitativ auf die DC-Platte aufgetragen.

5.6.3. Abbau von Phytochrom

a) Abbau von P_R und P_{FR} gemeinsam

Ein grünliches Lyophilisat mit 4,5 Phytochrom-Einheiten wurde in 1,7 ml Trispuffer (0,02 m, pH=7,8) gelöst, davon drei Proben à 0,5 ml ($\hat{=}$ 1,3 P-Einheiten) abgefüllt und mit je 2,5 ml Chromsäure versetzt. In einer Stunde bei RT verfärbten sich die Lösungen bei stetigem Rühren unter Ausflocken eines dicken Proteinniederschlages tiefviolett (Cr(III)-Komplex). Die Überstände der abzentrifugierten Proben wurden mit je 0,5 ml Äthylacetat dreimal extrahiert (a). Die drei Niederschläge wurden mit 2,5 ml Chromsäure bei 100° (b), 1,5 ml 2n Ammoniak bei RT (c) und 1,5 ml Ammoniak bei 100° (d) jeweils eine Stunde behandelt.

Die beiden ammoniakalischen Proben wurden anschließend mit 1 ml 4n H_2SO_4 unter Kühlung angesäuert und wieder abzentrifugiert und alle Lösungen wieder mit je 0,5 ml Äthylacetat dreimal extrahiert. Die Extrakte a,b,c und d wurden gewaschen, durch Abblasen mit Stickstoff eingeeengt und quantitativ auf die DC-Platte aufgetragen.

b) Abbau von P_R und P_{FR} getrennt

Die Arbeiten wurden bis zum Auftragen auf die DC-Platte unter Grünlicht ausgeführt.

Ein grünliches Lyophilisat mit 3,6 P-Einheiten wurde in 1,8 ml Trispuffer gelöst. Davon wurden zwei Proben zu je 0,85 ml entnommen ($\hat{=}$ 1,7 P-Einheiten) und die eine bei 660 nm 4 Minuten, die andere bei 730 nm 6 Minuten bestrahlt. Beide Proben wurden wiederum in je zwei gleiche Hälften à 0,4 ml ($\hat{=}$ 0,8 P-Einheiten) geteilt und zu jeder der vier Lösungen 2,0 ml Chromsäure gegeben. Die Lösungen, in denen ein dicker Proteinniederschlag ausflockte, wurden eine Stunde bei RT behandelt, abzentrifugiert und die Überstände dreimal mit je 0,3 ml Äthylacetat extrahiert ($a=P_R$, $b=P_{FR}$). Von den vier Niederschlägen wurden nach zweimaligem Waschen je zwei mit 2n Ammoniak und zwei mit Chromsäure bei 100° eine Stunde behandelt (Chromsäure 100°: $c=P_R$, $d=P_{FR}$; Ammoniak RT: $e=P_R$, $f=P_{FR}$); die ammoniakalischen Proben wurden nach Ansäuern und Abzentrifugieren ebenso dreimal mit Äthylacetat extrahiert wie die chromsauren.

Die sechs Extrakte wurden wieder gewaschen, eingeeengt und quantitativ auf die DC-Platte aufgetragen.

5.6.4. Vergleichssubstanzen

Zum Vergleich für die Ringe II, III und IV der Biliproteide wurde der Chromsäureabbau von Bilirubin durchgeführt. 0,5 mg (0,8 μ Mol) Bilirubin wurden in zwei Tropfen Aceton aufgelöst und 5 ml Chromsäure dazugegeben. Nach einer halben Stunde wurde einmal mit 0,2 ml Äthylacetat extrahiert. Aus der überstehenden Esterphase wurde direkt (wenig) auf die DC-Platte aufgetragen.

Als Vergleichssubstanz für Ring I der Biliproteide wurden 17,8 mg (0,1 mMol) kristallines 7a eingewogen, in Methanol/Ammoniak aufgenommen, nach zwei Stunden zur Trockne eingeengt, in Äthylacetat wieder gelöst und diese Lösung in einem Meßkolben auf 10 ml aufgefüllt, so daß die Maßlösung 140 μ g 7/0,1 ml enthielt (Fehler <10%). Von dieser Lösung wurden mit Mikrokapillaren, deren Füllvolumen 1 μ l beträgt, verschiedene Vielfache von 1,4 μ g 7 (Füllung einer Mikrokapillare) auf die DC-Platte aufgetragen. .

6. Zusammenfassung

1. Der Chromsäureabbau eines Photoadduktes (14) von Cystein-methylester an Bilirubin führt zur gleichen Substanz (11) wie der Abbau eines Adduktes (10) von Cystein-methylester an Protoporphyrin ("Porphyrin c"). Dieses Abbauprodukt ist äußerst unbeständig und läßt sich lediglich in der DC charakterisieren. Seine Photolyse führt zu E-2-Äthyliden-3-methylsuccinimid (5), das in präparativer DC isoliert und durch MS charakterisiert werden konnte.
2. Eine Reihe von Succin- und Maleinimiden wird mit UV bestrahlt und die Photoreaktivität dünn-schichtchromatographisch verfolgt. Dabei wandelt sich 2-Äthyl-3-methylmaleinimid (24) zum großen Teil in E-2-Äthyliden-3-methylsuccinimid (5) um. Auch andere Imide zeigen unter den gewählten Bedingungen eine partielle Umsetzung.
3. 2-(1-Chloräthyl)-3-methylsuccinimid (7) wird synthetisiert und in basischer Lösung mit Äthanthiol in 2-[1-(Äthylthio)-äthyl]-3-methylsuccinimid (8) überführt. Die Umsetzung $7 \rightarrow 8$ wird näher untersucht und dabei festgestellt, daß 7 zunächst zu E- und Z-2-Äthyliden-3-methylsuccinimid (5/6) eliminiert und die Addition von Äthanthiol an 5/6 zu 8 führt. Von den bei der Synthese von 7 auftretenden Isomeren 7a und 7b wird 7a näher charakterisiert. Die Eliminierung der beiden Isomeren bei Einwirkung von Basen verläuft quantitativ und stereospezifisch: 7a wird zu 5, 7b zu 6.
4. Die Umsetzung des Thioäthers 8 mit Chromsäure wird untersucht. Es bilden sich zwei Stereoisomere des Sulfons 20, die kristallisiert und charakterisiert werden. Die Art der Isomerie ist mit den Mitteln der NMR-Spektroskopie nicht hinreichend zu klären. Durch eine Röntgenstrukturanalyse ist für ein Isomeres (20b) die exakte sterische Konfiguration (2'S, 2R, 3R/2'R, 2S, 3S) festgelegt. Aufgrund dieser Zuordnung wird nach den NMR-Daten - unter Zuhilfenahme von Kalottenmodellen - für das andere Isomere (20a) die Konfiguration 2'S, 2S, 3S/2'R, 2R, 3R wahrscheinlich gemacht; 20a und 20b sind danach an C-2/C-3 trans-konfiguriert, unterscheiden sich aber durch die relative Konfiguration an C-2/C-2'.

5. Die Sulfon-Isomeren 20a und 20b zeigen bei Einwirkung von Basen ein unterschiedliches Eliminierungsverhalten: 20a eliminiert quantitativ zu 5; von 20b eliminieren nur etwa 10%, vorwiegend zu 6. Da in 20b an C-2/C-2' eine relative S,R- bzw. R,S-Konfiguration durch Röntgenstrukturanalyse nachgewiesen ist und für die Eliminierung ein trans-einheitlich verlaufender E₂-Mechanismus wahrscheinlich gemacht werden kann, ergibt sich die Aussage, daß unter den Versuchsbedingungen aus einer S,R- bzw. R,S-Konfiguration an C-2/C-2' (β) stets das Eliminierungsprodukt 6, aus einer S,S- bzw. R,R-Konfiguration an C-2/C-2' (α) das Eliminierungsprodukt 5 freigesetzt wird.
6. Die Reaktionsfolge der Thioladdition an 5/6, Chromsäureoxidation und Eliminierung wird auf Cystein, Cystein-methylester und N-Acetylcystein-methylester übertragen. Die Reaktion des Cystein-Adduktes 9 und des durch Chromsäureoxidation von 9 erhaltenen Sulfons 29 mit Ammoniak und Chromsäure bei RT und 100° wird quantitativ erfaßt. Aufgrund der hohen Eliminierungsrate der Gesamtmenge des Sulfons 29 bei Einwirkung von Ammoniak bei RT wird ein sterisches Modell für die Isomerenbildung in Abhängigkeit von der Größe des Substituenten an C-2' diskutiert.
7. Der kombinierte Chromsäure-/Ammoniak-(CrO₃/NH₃-)Abbau der Thioäther 8 und 9 (Behandlung zuerst mit Chromsäure und anschließend mit verdünnten Ammoniak, beides bei RT) führt zu wesentlich höherer Ausbeute des Eliminierungsproduktes 2-Äthyliden-3-methylsuccinimid (5/6) als der hydrolytische Chromsäureabbau (Behandlung mit Chromsäure bei 100°).
8. Um die Modellversuche auf Biliproteide übertragen zu können, werden C-Phycocerythrin und C-Phycocyanin, beide aus der Alge Pseudanabaena sp., sowie Phytochrom aus einem vorgereinigten Extrakt von Haferkeimlingen isoliert. Die Biliproteide werden spektral charakterisiert und als Lyophilisat dem Abbau unterworfen.
9. C-Phycocerythrin, C-Phycocyanin und ein Chromopentapeptid aus C-Phycocerythrin werden dem Chromsäureabbau unter nicht-hydrolytischen und hydrolytischen Bedingungen sowie dem CrO₃/NH₃-Abbau unterworfen. Die Abbauprodukte der Chromophore werden in der DC quantitativ erfaßt. Die Ausbeuten an 5, dem Abbau-

produkt aus Ring I der Chromophore, liegen beim CrO_3/NH_3 -Abbau etwa dreimal so hoch wie beim hydrolytischen Chromsäureabbau, dem bisher üblichen Verfahren zum Nachweis von Ring I. Die übrigen Daten der Abbauprobe stimmen mit früheren Versuchen überein. Durch das Ergebnis des CrO_3/NH_3 -Abbaus ist sowohl für C-Phycocyanin wie für C-Phycoerythrin die Thioätherbindung an C-2¹ als Proteinverknüpfung der Chromophore bewiesen.

10. Ein teilweise proteolysiertes C-Phycoerythrin, das gegenüber nativem C-Phycoerythrin ein verändertes spektrales Verhalten aufweist, ergibt im Gegensatz zum nativen Phycoerythrin beim nicht-hydrolytischen Chromsäureabbau 5, beim CrO_3/NH_3 -Abbau daneben 6. Die sich daraus ergebenden sterischen Konsequenzen werden diskutiert.

11. Phytochrom wird sowohl als Gemisch der photoreversiblen Formen als auch nach P_R und P_{FR} getrennt den beiden Abbaumethoden unterworfen. Beim nicht-hydrolytischen Chromsäureabbau wird dabei nur Hämatinsäureimid (12) als Abbauprodukt des Chromophors in Freiheit gesetzt. Das unregelmäßig in Spuren auftretende 2-Vinyl-3-methylmaleinimid (35) kann Ring IV zugeordnet werden.

Bei Hydrolyse des Proteinniederschlags tritt wieder Hämatinsäureimid (12) auf, darüber hinaus ein Imid, das als Artefakt von Ring IV diskutiert wird. Ein Imid, das Ring I des Chromophors zugeordnet werden könnte, läßt sich weder unter nicht-hydrolytischen noch unter hydrolytischen Bedingungen beim Chromsäureabbau nachweisen.

Beim CrO_3/NH_3 -Abbau läßt sich dagegen 2-Äthyliden-3-methylsuccinimid (5) als Abbauprodukt von Ring I nachweisen. Die Ausbeute an 5 entspricht der beim CrO_3/NH_3 -Abbau der anderen Biliproteide gefundenen.

Die Ergebnisse der Chromsäure- und CrO_3/NH_3 -Abbauteile sind bei beiden Formen des Phytochroms, P_R und P_{FR} , gleich. Damit ist für die Proteinbindung an Ring I des Chromophors sowohl in P_R wie in P_{FR} die Thioätherstruktur nachgewiesen.

12. Aufgrund der sterischen Aussagen bei den Modellversuchen und der analogen Eliminierungsreaktionen bei den Biliproteiden läßt sich für alle untersuchten Biliproteide eine sterische

Konfiguration von Ring I angeben: Danach ist die relative Konfiguration zwischen C-2 und C-3 jeweils trans, zwischen C-2 und C-2' jeweils vom Typ α . Da für das asymmetrische Zentrum an C-1 sowohl beim roten wie beim blauen Chromophor der Biliproteide die R-Konfiguration nachgewiesen worden war, lassen sich folgende absolute Konfigurationen für C-Phycerythrin und C-Phycocyanin mit Sicherheit, für Phytochrom mit großer Wahrscheinlichkeit angeben: Alle drei Asymmetriezentren an Ring I, also C-1, C-2 und C-2¹ besitzen R-Konfiguration.

Literaturverzeichnis

1. ARNOLD, W., und J.R. OPPENHEIMER: Internal conversion in the photosynthetic mechanism of blue-green algae. J. Gen. Physiol. 33, 423 (1950)
2. BARTSCH, R.A., K.E. WIEGERS und D.M. GURITZ: Orientation in base-promoted β -elimination reactions. Effects of base strength and size. J. Am. Chem. Soc. 96, 430 (1974)
3. BELLAMY, L.J.: Ultrarot-Spektrum und chemische Konstitution, 2. Aufl.. Dr. Dietrich Steinkopff Verlag, Darmstadt, 1966.
4. BENNETT, A., und L. BOGORAD: Properties of subunits and aggregates of blue-green algal biliproteins. Biochemistry 10, 3625 (1971)
5. BERTELLI, D.J., und C. GOLINO: Synthesis and study of pseudo-aromatic compounds. III. The correlation of Nuclear-Magnetic Resonance solvent shifts with π -electronic delocalization energies in aromatic compounds. J. Org. Chem. 30, 368 (1965)
6. BEUHLER, R.J., R.C. PIERCE, L. FRIEDMAN und H.W. SIEGELMAN: Cleavage of phycocyanobilin from C-Phycocyanin. J. Biol. Chem. 251, 2405 (1976)
7. BODE, J., und H. BROCKMANN JR.: Zur relativen Konfiguration 2,3-dialkyl-substituierter Bernsteinsäuren. Chem. Ber. 105, 34 (1972)
8. BOURGEOIS, E., und P. HUBER: Recherches sur les aptitudes réactionnelles des dérivés bromés aromatiques. III: Action des bromo-nitro-benzènes sur les thiophénates. Recl. Trav. Chim. Pays-Bas 31, 33 (1912)
9. BROCKMANN, H.JR.: Zur absoluten Konfiguration des Bacteriochlorophylls. Angew. Chem. 80, 234 (1968)
10. BROCKMANN, H.JR., und J. KLEBER: Bacteriochlorophyll B. Tetrahedron Letters 1970, 2195
11. BROCKMANN, H.JR., und G. KNOBLOCH: Cis-trans-isomere 3-Äthyliden-2-methylsuccinimide. Tetrahedron Letters 1970, 267
12. BROCKMANN, H.JR., und G. KNOBLOCH: Die absolute Konfiguration des 2-Äthyliden-3-methylsuccinimids. Ein Beitrag zur Bestimmung der absoluten Konfiguration von Phycobilinen und Phytochrom. Chem. Ber. 106, 803 (1973)
13. BROCKMANN, H.JR., G. KNOBLOCH, H. PLIENINGER, K. EHL, J. RUPPERT, A. MOSCOWITZ und C.J. WATSON: The absolute configuration of natural (-)-stercobilin and other urobilinoid compounds. Proc. Nat. Acad. Sci. US 68, 2141 (1971)

14. BROCKMANN, H.JR., und D. MÜLLER-ENOCH: Die absolute Konfiguration der (-)-threo-3-Äthyl-2-methylbernsteinsäure. *Angew. Chem.* 80, 562 (1968)
15. BROOKS, R.C.: Preparation, purification and analysis of peptides derived from *Cryptomonad phycoerythrin*. Dissertation Univ. Chicago, 1970.
16. BROOKS, R.C., und D.J. CHAPMAN: Bilin-apoprotein bonds in *Cryptomonad phycoerythrin*. *Phytochemistry* 11, 2263 (1972)
17. BUTLER, W.L., H.C. LANE und H.W. SIEGELMAN: Nonphotochemical transformations of phytochrome in vivo. *Plant Physiol.* 38, 514 (1963)
18. BUTLER, W.L., K.H. NORRIS, H.W. SIEGELMAN und S.B. HENDRICKS: Detection, assay, and preliminary purification of the pigment controlling photoresponsive development in plants. *Proc. Nat. Acad. Sci. US* 45, 1703 (1959)
19. CAHN, R.S., C. INGOLD und V. PRELOG: Spezifikation der molekularen Chiralität. *Angew. Chem.* 78, 413 (1966)
20. CHAPMAN, D.J., und D.L. FOX: Bile pigment metabolism in the sea-hare *Aplysia*. *J. Exper. Marine Biol. Ecology* 4, 71 (1969)
21. CONRAD, M.: Über eine Synthese der Brenzweinsäure aus Acetessigester. *Liebigs Ann. Chem.* 188, 226 (1877)
22. CRESPI, H.L., L.J. BOUCHER, G.D. NORMAN, J.J. KATZ und R.C. DOUGHERTY: Structure of phycocyanobilin. *J. Am. Chem. Soc.* 89, 3642 (1967)
23. CRESPI, H.L., und U.H. SMITH: The chromophor-protein bounds in phycocyanin. *Phytochemistry* 9, 205 (1970)
24. CRESPI, H.L., U. SMITH und J.J. KATZ: Phycocyanobilin. Structure and exchange studies by nuclear magnetic resonance and its mode of attachment in phycocyanin. A model for phytochrome. *Biochemistry* 7, 2232 (1968)
25. CROWELL, T.J., und L. HWANG: Acid-base catalysis and autocatalysis of a dehydrochlorination. *J. Am. Chem. Soc.* 98, 4315 (1976)
26. DUYSSENS, L.M.N.: Transfer of light energy within the pigment systems present in photosynthesizing cells. *Nature* 168, 548 (1951)
27. FENTON, G.W., und C.K. INGOLD: Influence of poles and polar linkings on the course pursued by elimination reactions. Part IV. Further experiments on the olefinic degradation of sulphones. *J. Chem. Soc.* 1929, 2338

28. FICKEN, G.E., R.B. JONES und R.P. LINSTEAD: Chlorophyll and related compounds. Part IV. The position of the extra hydrogens in chlorophyll. The oxidation of pyrophaeophorbide a. J. Chem. Soc. 1956, 2272
29. FISCHER, H., und H. ORTH: Die Chemie des Pyrrols. Bd. II/1, S. 619, Akademische Verlagsgesellschaft Leipzig, 1937
30. FLEMING, J.: Absolute configuration and the structure of chlorophyll. Nature 216, 151 (1967)
31. FLINT, L.H., und E.D. McALISTER: Wave lengths of radiation in the visible spectrum inhibiting the germination of light-sensitive lettuce seed. Smithsonian Inst. Publs. Misc. Coll. 94, 1 (1935)
32. FRENCH, C.S., und V.K. YOUNG: The fluorescence spectra of red algae and the transfer of energy from phycoerythrin to phycocyanin and chlorophyll. J. Gen. Physiol. 35, 873 (1952)
33. FROMM, E., H. BENZINGER und F. SCHÄFER: Abkömmlinge des Äthylen-mercaptans, Dithioäthylens und des Dithioacetylens. Liebigs Ann. Chem. 394, 325 (1912)
34. FRY, K.T., und F.E. MUMFORD: Isolation and partial characterization of a chromophore-peptide fragment from pepsin digests of phytochrome. Biochem. Biophys. Res. Comm. 45, 1466 (1971)
35. FUJITA, Y., und A. HATTORI: Preliminary note on a new phycobilin pigment isolated from blue-green algae. J. Biochem. (Tokyo) 51, 89 (1962)
36. FURUYA, M.: Biochemistry and Physiology of Phytochrome. In: L. REINHOLD and Y. LIWSCHITZ (ed.), Progress in Phytochemistry, Vol. 1, S. 347. Interscience Publ. London-New York-Sydney, 1968
37. GANTT, E., und S.F. CONTI: Granules associated with the chloroplast lamellae of *Porphyridium cruentum*. J. Cell Biol. 29, 423 (1966)
38. GANTT, E., M.R. EDWARDS und L. PROVASOLI: Chloroplast structure of the Cryptophyceae. Evidence for phycobiliproteins within intrathylakoidal spaces. J. Cell Biol. 48, 280 (1971)
39. GANTT, E., und C.A. LIPSCHULTZ: Phycobilisomes of *Porphyridium cruentum*. I. Isolation. J. Cell Biol. 54, 313 (1972)
40. GLAZER, A.N., und G. COHEN-BAZIRE: Subunit structure of the phycobiliproteins of blue-green algae. Proc. Nat. Acad. Sci. US 68, 1398 (1971)
41. GLAZER, A.N., und S. FANG: Chromophore content of blue-green algal phycobiliproteins. J. Biol. Chem. 248, 659 (1973)
42. GLAZER, A.N., und C.S. HIXSON: Characterization of R-Phycocyanin. J. Biol. Chem. 250, 5487 (1975)

43. GRAY, C.H., G.A. LEMMON und D.C. NICHOLSON: The orientation of the alkyl groups of the end rings of natural and racemic sterco-bilin. J. Chem. Soc. (C) 1967, 178
44. GROMBEIN, S.: Untersuchungen zur Struktur der Phytochrom-Chromophore und zur Partikelbindung von Phytochrom. Dissertation Univ. München, 1976
45. GROMBEIN, S., W. RÜDIGER und H. ZIMMERMANN: The structures of the phytochrome chromophore in both photoreversible forms. Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 356, 1709 (1975)
46. GROTH, S.F. de St., R.G. WEBSTER und A. DATYNER: Two new staining procedures for quantitative estimation of proteins on electrophoretic strips. Biochim. Biophys. Acta 71, 377 (1963)
47. HAXO, F.T., und L.R. BLINKS: Photosynthetic action spectra of marine algae. J. Gen. Physiol. 33, 389 (1950)
48. HIROSE, H., S. KUMANO und K. MADONO: Spectroscopic studies on phycoerythrins from Cyanophycean and Rhodophycean algae with special reference to their phylogenetical relations. Bot. Mag. Tokyo 82, 197 (1969)
49. JACKMAN, L.M., und S. STERNHELL: Application of Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy in Organic Chemistry, 2. Ed; Pergamon Press, Oxford-New York-Toronto-Sydney-Braunschweig, 1969
 - a) S. 111
 - b) S. 247
50. KLEBS, G.: Zur Entwicklungs-Physiologie der Farnprothallien. Sitz.-Ber. Heidelberger Akad. Wiss., Math.-Naturw. Kl.; Abt. B: Biol. Wissensch.. 4.Abhandl. 1916; 3.und 7.Abhandl. 1917
51. KLEIN, G.: Der Chromsäureabbau von "Porphyrin c" - ein Modell für den Abbau von Biliproteiden. Diplomarbeit Univ. Saarbrücken, 1972
52. KNOBLOCH, G.: Konstitution und absolute Konfiguration natürlicher Tetrapyrrolverbindungen. Dissertation Techn. Univ. Braunschweig, 1972
53. KÖST, H.-P.: Strukturuntersuchungen an den Phycobiliproteiden B-Phycoerythrin aus *Porphyridium cruentum* und C-Phycocyanin aus *Anacystis nidulans*. Dissertation Univ. München, 1974
54. KÖST, H.-P., und W. RÜDIGER: Cis-trans-isomere 2-Äthyliden-3-methylsuccinimide aus Phycoerythrin. Tetrahedron Letters 1974, 3417
55. KÖST, H.-P., W. RÜDIGER und D.J. CHAPMAN: Über die Bindungen zwischen Chromophor und Protein in Biliproteiden. I. Abbaugesuche und Spektraluntersuchungen. Liebigs Ann. Chem. 1975, 1582

56. KÖST-REYES, E., H.-P. KÖST und W. RÜDIGER: Über die Bindungen zwischen Chromophor und Protein in Biliproteiden. II. Nachweis von Cystein als bindende Aminosäure in B-Phycoerythrin. *Liebigs Ann. Chem.* 1975, 1594
57. KRAFFT, F., und E. BOURGEOIS: Über einige Sulfide des Naphtalins. *Ber. dtsh. chem. Ges.* 23, 3045 (1890)
58. KRATZ, W.A., und J. MYERS: Nutrition and growth of several blue-green algae. *Amer. J. Bot.* 42, 282 (1955)
59. KROES, H.H., A. van ROOIJEN, J.M. GEERS und E.H.M. GREUDEL: Large-scale isolation of phytochrome from oat seedlings. *Biochim. Biophys. Acta* 175, 409 (1969)
60. KYLIN, H.: Über Phycoerythrin und Phycocyanin bei *Ceramium rubrum*. *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* 69, 169 (1910)
61. LEMBERG, R., und J.W. LEGGE: Hematin Compounds and Bile Pigments. *Interscience Publ.*, New York 1949
62. MALICHENKO, B.F., L.P. ROBOTA und N.N. KALIBABCHUK: Schwefelhaltige Dicarbonsäuren des Biphenyls und des Oktafluorbiphenyls. *Zh. Org. Khim.* 11, 796 (1975)
63. MANNITTO, P.: Photochemistry of bilirubin. *Experientia* 27, 1147 (1971)
64. MANNITTO, P., und D. MONTI: Photoaddition of sulphhydryl groups to bilirubin in vitro. *Experientia* 28, 379 (1972)
65. MANNITTO, P., und D. MONTI: Regiospecificity in photochemical additions to bilirubin. Photoinduced reaction of 2-vinylbiladienes-a,c with the disulphide bond. *J. Chem. Soc. (C)* 1972, 1301
66. MARGOLIASH, E., und A. SCHEJTER: Cytochrome c. *Advan. Protein Chem.* 21, 113 (1966)
67. MARTIN, D., A. WEISE und H.-J. NICLAS: Das Lösungsmittel Dimethylsulfoxid. *Angew. Chem.* 79, 340 (1967)
68. MUCKLE, G., und W. RÜDIGER: Untersuchungen an Chromopeptiden von C-Phycoerythrin aus *Pseudanabaena* sp., in Vorbereitung
69. MUMFORD, F.E.: Studies on the phytochrome dark reaction in vitro. *Biochemistry* 5, 522 (1966)
70. O'CARRA, P., und C. O'hEOCHA: Bilins released from algae and biliproteins by methanolic extraction. *Phytochemistry* 5, 993 (1966)
71. O'CARRA, P., C. O'hEOCHA und D.M. CARROLL: Spectral properties of the phycobilins. II. phycoerythrobilin. *Biochemistry* 3, 1343 (1964)

72. O'hEOCHA, C.: Spectral studies of the phycobilins. I. phycocyanobilin. *Biochemistry* 2, 375 (1963)
73. ORGANIKUM, Organisch-chemisches Grundpraktikum. Von einem Autorenkollektiv. 6. Aufl., S.213, VEB Deutscher Verlag der Wissenschaften, Berlin 1967
74. POMERANTZ, A., und R. CONNOR: α -Alkylsulfonylamides. *J. Am. Chem. Soc.* 61, 3386 (1939)
75. RAULIN, F., und G. TOUPANCE: Etude cinétique des réactions en solution aqueuse de nitriles maloniques avec l'ethanthiol. Incorporation du soufre dans les synthèses prébiotiques. *Bull. Soc. chim. Fr.* 1976, 667
76. REINDEL, F., und W. HOPPE: Über eine Färbemethode zum Anfärben von Aminosäuren, Peptiden und Proteinen auf Papierchromatogrammen. *Chem. Ber.* 87, 1103 (1954)
77. RICE, H.V., und W.R. BRIGGS: Partial characterization of oat and rye phytochrome. *Plant Physiol.* 51, 927 (1973)
78. RICE, H.V., W.R. BRIGGS und C.J. JACKSON-WHITE: Purification of oat and rye phytochrome. *Plant Physiol.* 51, 917 (1973)
79. RÜDIGER, W.: Über die Abwehrfarbstoffe von *Aplysia*-Arten. I. Aplysiocyanin, ein neuartiger Gallenfarbstoff. *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* 348, 129 (1967)
80. RÜDIGER, W.: Über die Abwehrfarbstoffe von *Aplysia*-Arten. II. Die Struktur von Aplysiocyanin. *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* 348, 1554 (1967)
81. RÜDIGER, W.: Bile pigments: A new degradation technique and its application. In: T.W. GOODWIN (Ed.), *Porphyryns and Related Compounds*, S. 121, Academic Press, London 1968
82. RÜDIGER, W.: Vergleichende Biochemie der Gallenfarbstoffe. Habilitationsschrift, Univ. Saarbrücken, 1968
83. RÜDIGER, W.: Chromsäure- und Chromatabbau von Gallenfarbstoffen. *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* 350, 1291 (1969)
84. RÜDIGER, W.: Neues aus Chemie und Biochemie von Gallenfarbstoffen. *Angew. Chem.* 82, 527 (1970)
85. RÜDIGER, W.: Gallenfarbstoffe und Biliproteide. *Fortschr. Chem. org. Naturstoffe* 29, 59 (1971)
86. RÜDIGER, W.: Chemistry of phytochrome chromophore. In: K. MITRAKOS und W. SHROPSHIRE jr. (Ed.), *Phytochrome*, S. 127, Academic Press, London und New York, 1972
87. RÜDIGER, W.: Phycobiliproteide. *Ber. Deutsch. Bot. Ges.* 88, 125 (1975)

88. RÜDIGER, W., und D.L. CORRELL: Über die Struktur des Phytochrom-Chromophors und seine Protein-Bindung. Liebigs Ann. Chem. 723, 208 (1969)
89. RÜDIGER, W., und W. KLOSE: Synthese von Methyl-äthyliden-succinimid. Tetrahedron Letters 1967, 1177
90. RÜDIGER, W., H.-P. KÖST, H. BUDZIKIEWICZ und V. KRAMER: Die Struktur von Mesobilirhodin. Liebigs Ann. Chem. 738, 197 (1970)
91. RÜDIGER, W., und F.E. MUMFORD: Structural studies on native phytochrome. Unveröffentlicht
92. RÜDIGER, W., und P. O'CARRA: Studies on the structures and apoprotein linkages of the phycobilins. Europ. J. Biochem. 7, 509 (1969)
93. SCHENK, G.O., W. HARTMANN, S.-P. MANNSFELD, W. METZNER und C.H. KRAUCH: Vierringssynthesen durch photosensibilisierte symmetrische und gemischte Cyclo-Additionen. Chem. Ber. 95, 1642 (1962)
94. SCHOCH, S., I. BLOS und W. RÜDIGER: Die Massenspektren substituierter Succinimide. Org. Mass Spectrom. 10, 797 (1975)
95. SCHOCH, S., G. KLEIN, U. LINSSENMEIER und W. RÜDIGER: Synthese und Reaktionen von Äthyliden-methylsuccinimid. Tetrahedron Letters 1974, 2465
96. SCHOCH, S., G. KLEIN, U. LINSSENMEIER und W. RÜDIGER: Über die Bindungen zwischen Chromophor und Protein in Biliproteiden. III. Eliminierungsreaktionen an Modells-substanzen. Liebigs Ann. Chem. 1976, 549
97. SCHOCH, S., und W. RÜDIGER: Über die Bindungen zwischen Chromophor und Protein in Biliproteiden. IV. Modelle für Phytochrom. Liebigs Ann. Chem. 1976, 559
98. Sephadex-Ionenaustauscher, Leitfaden für Ionenaustausch-Chromatographie, Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala (Schweden)
99. SIEGELMAN, H.W., D.J. CHAPMAN und W.J. COLE: The bile pigments of plants. In: T.W. GOODWIN (Ed.), Porphyrins and Related Compounds, S. 107, Academic Press, London 1968
100. STAHL, E.: Dünnschichtchromatographie. 2. Aufl., S. 56, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York 1967
101. TENHUNEN, R., H.S. MARVER und R. SCHMID: Microsomal heme oxygenase. Characterization of the enzyme. J. Biol. Chem. 244, 6388 (1969)
102. TENHUNEN, R., M.E. ROSS, H.S. MARVER und R. SCHMID: Reduced nicotin-amide-adenin dinucleotide phosphate dependent biliverdin reductase: Partial purification and characterization. Biochemistry 9, 298 (1970)

103. TOBIN, E.M., und W.R. BRIGGS: Studies on the protein con-formation of phytochrome. Photochem. Photobiol. 18, 487 (1973)
104. TROXLER, R.F.: Synthesis of bile pigments in plants. Formation of carbon monoxid and phycocyanobilin in wild-type and mutant strains of the alga, *Cyanidium caldarium*. Biochemistry 11, 4235 (1972)
105. TROXLER, R.F., und J.M. DOKOS: Formation of carbon monoxide and bile pigment in red and blue-green algae. Plant Physiol. 51, 72 (1973)
106. TROXLER, R.F., J.A. FOSTER, A.S. BROWN und C. FRANZBLAU: Properties and amino acid sequences at the amino terminus of the α and β subunits of *Cyanidium caldarium* phycocyanin. Biochemistry 14, 268 (1975)
107. TUPPY, H., und J.B. NEILANDS: Crystalline synthetic porphyrin c. Biochim. Biophys. Acta 38, 351 (1960)
108. WAGENMANN, R., und W. RÜDIGER: Untersuchungen an C-Phycocerythrin und C-Phycocyanin aus *Pseudanabaena* sp., in Vorbereitung
109. WEHRMEYER, W.: Zur Feinstruktur der Chloroplasten einiger photo-autotropher Cryptophyceen. Arch. Mikrobiol. 71, 367 (1970)
110. WEYGAND-HILGETAG: Organisch-chemische Experimentierkunst, 4. Aufl., S. 695, Verlag Johann Ambrosius Barth, Leipzig 1970
111. WILDMAN, R.B., und C.C. BOWEN: Phycobilisomes in blue-green algae. J. Bact. 117, 866 (1974)
112. YAGUPOLSKII, L.M., N.V. KONDRATENKO und V.P. SAMBUR: A new method for the synthesis of aryl and heteroaryl trifluoromethyl sulfides. Synthesis 1975, 721
113. ZIMMERMANN, H.: Untersuchungen zur Frage der Bindung der Indolyl-3-essigsäure an Proteine bei *Avena sativa* L. und *Helianthus annuus* L., Dissertation Univ. Saarbrücken, 1971
114. ZINCKE, T., und R. BRUNE: Über Schwefelderivate des o-Kresols. Ber. dtsch. chem. Ges. 44, 185 (1911)

Lebenslauf

17.11.1943	Geburt in München
September 1949	Einschulung in Riederau/Oberbayern
April 1950	Übertritt in die zweite Klasse der Volksschule in Kaiserslautern
April 1953	Übertritt in das Staatliche Altsprachliche Gymnasium Kaiserslautern
März 1962	Abitur am gleichen Gymnasium
1962 - 1964	Studium an der Philosophischen Fakultät der Universität Mainz
Mai 1964	Beginn des Studiums der Chemie an der Universität Saarbrücken
1971	Diplom-Hauptprüfung in Chemie an der Universität Saarbrücken
1972	Diplomarbeit am Botanischen Institut der Universität München
Januar 1973	Beginn der Dissertation am Botanischen Institut der Universität München (Lehrstuhl Phytochemie) unter Leitung von Prof. Dr. W. Rüdiger
29.3.1974	Heirat mit Frl. Helga Granold
15.7.1976	Geburt der Tochter Gundula

